

MÔNICA BEATRIZ PAROLIN

**ACÚMULO DE FERRO NO ENXERTO HEPÁTICO EM PACIENTES
COM E SEM HEMOSSIDEROSE HEPÁTICA PRÉ-TRANSPLANTE**

**Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-
Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciên-
cias da Saúde, Universidade Federal do Paraná.**

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Werneck Lopes

Co-orientador: Prof. Dr. Kenneth P. Batts

CURITIBA

2002

Parolin, Mônica Beatriz

Acúmulo de ferro no enxerto hepático em pacientes com e sem hemossiderose hepática pré-transplante / Mônica Beatriz Parolin. - Curitiba, 2002.

x, 48f

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo Werneck Lopes.

Tese (Doutorado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

1. Transplante de fígado. 2. Hemossiderose. 3. Cirrose hepática. 4. Sobrecarga de ferro. I. Título.

NLM WI

770

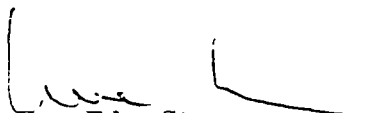


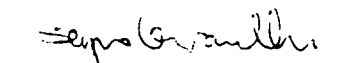
PARECER


PARECER CONJUNTO dos Professores Dra. Edna Strauss, Dr. Waldomiro Dantas, Dr. Sergio Ossamu Ioshii, Dr. Julio César Uili Coelho e Dr. Reginaldo Werneck Lopes, sobre a Tese de Doutorado em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, elaborada por Mônica Beatriz Parolin, intitulada: **“ACÚMULO DE FERRO NO ENXERTO HEPÁTICO EM PACIENTES COM E SEM HEMOSSIDEROSE HEPÁTICA PRÉ-TRANSPLANTE”**.

A Banca Examinadora considerou que Mônica Beatriz Parolin apresentou trabalho adequado para Tese de Doutorado e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe: Conceito "A", correspondente ao Grau "10", sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de DOUTOR EM MEDICINA e a publicação da tese em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.

Curitiba, 18 de dezembro de 2.002.


Dra. Edna Strauss


Dr. Sergio Ossamu Ioshii


Dr. Reginaldo Werneck Lopes


Dr. Waldomiro Dantas


Dr. Julio César Uili Coelho

Dedico

A meus pais Marilú e Lineu e minha irmã Lilian.

Aos pacientes do Serviço de Transplante Hepático do
Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Atrás de toda pesquisa, de toda aquisição de conhecimento deve estar o genuíno desejo de aprimoramento do ser humano. O exercício da medicina nos dá a extraordinária oportunidade de crescer intelectual e espiritualmente, à medida que o conhecimento adquirido se traduz em ações que podem curar ou minimizar o sofrimento físico e ajudar a restaurar a dignidade e a esperança dos pacientes.

Todos nós carregamos um pouco da história de São Lucas, somos médicos de homens e de almas.

Agradecimentos

Nenhum trabalho é obra de uma pessoa só.

Estes agradecimentos se estendem a todos que de maneira direta ou indireta auxiliaram na concretização desse estudo, trazendo idéias, sugestões e mesmo ações.

Se há mérito nessa obra, deve pertencer a todos que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

Entre muitos a quem, devemos agradecer, citamos especialmente:

Dr. Reginaldo Lopes Werneck, amigo leal, cujo exemplo de médico e professor despertou em mim a vocação para o estudo das doenças hepáticas.

Dr. Russell H. Wiesner, Diretor Clínico do Programa de Transplante Hepático da Clínica Mayo, Rochester, Minnesota, que me proporcionou a oportunidade de conhecer um dos melhores programas de transplante hepático da atualidade. Durante os meses em que lá estive pude constatar a fundamental importância da abordagem multidisciplinar no tratamento dos pacientes. Esse modelo assistencial influenciou decisivamente minhas atividades profissionais e acadêmicas e contribuiu para aprimorar o Programa de Transplante Hepático do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Dr. Kenneth P. Batts e Dr. Lawrence J. Burgart, patologistas com vasta experiência em doenças hepáticas e transplante hepático com os quais tive a honra de trabalhar. O aprendizado adquirido na área da histopatologia hepática tem sido de excepcional valor no acompanhamento clínico e tratamento dos pacientes atendidos no Serviço de Transplante Hepático do Hospital de Clínicas.

Dr. David J. Brandhagen, da Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia da Clínica Mayo, atual coordenador de linha de pesquisa na área de hemocromatose hereditária, pelo apoio e incentivo durante a revisão do manuscrito.

Alan R. Zinsmeister e William Scott Harmsen, da Seção de Bioestatística da Clínica Mayo, pela minuciosa análise estatística dos dados coletados na pesquisa.

Dra. Mônica Cat, pela valiosa interpretação do material estatístico.

Dr. Salmo Raskin, pela preclara elucidação da metodologia das mutações genéticas

Dr. Júlio César Uili Coelho, Chefe do Serviço de Transplante Hepático do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela confiança ao abrir as portas desse renomado Serviço para minhas atividades de hepatologista. Minha gratidão pela excepcional oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

À equipe do Serviço de Transplante Hepático, pelo companheirismo e incansável dedicação.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE TABELAS | vi |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES | vii |
| LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS | viii |
| RESUMO | ix |
| ABSTRACT | x |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 OBJETIVO | 3 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 2.1 AVANÇOS NA COMPREENSÃO DA HOMEOSTASE DO FERRO | 4 |
| 2.1.1 Absorção Intestinal | 4 |
| 2.1.2 Transporte e Armazenamento do Ferro nos Tecidos | 11 |
| 2.2 O FÍGADO E O METABOLISMO DO FERRO | 12 |
| 2.3 SOBRECARGA DE FERRO NAS DOENÇAS HEPÁTICAS AVANÇADAS | 14 |
| 2.4 ACÚMULO DE FERRO NO ENXERTO HEPÁTICO DE PACIENTES COM HEMOSSIDE-ROSE HEPÁTICA PRÉ-TRANSPLANTE | 16 |
| 3 CASUÍSTICA E MÉTODOS | 19 |
| 3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO | 19 |
| 3.2 PACIENTES E MÉTODOS | 19 |
| 3.2.1 População Estudada | 19 |
| 3.2.2 Grupo Controle | 22 |
| 3.2.3 Dados Clínicos | 23 |
| 3.2.4 Testes Laboratoriais | 23 |
| 3.2.5 Avaliação Histológica | 23 |
| 3.2.6 Quantificação do Ferro no Tecido Hepático | 24 |
| 3.2.7 Teste Genético para as Mutações do Gene <i>HFE</i> | 24 |
| 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 26 |
| 4 RESULTADOS | 28 |
| 4.1 DEPÓSITO DE FERRO NOS ESPÉCIMES DE BIOPSIA DO ENXERTO HEPÁTICO NO PERÍODO PÓS-TRANSPLANTE PRECOCE | 28 |
| 4.2 DEPÓSITO DE FERRO NOS ESPÉCIMES DE BIOPSIA DO ENXERTO HEPÁTICO NO PERÍODO PÓS-TRANSPLANTE TARDIO | 31 |
| 5 DISCUSSÃO | 35 |
| 6 CONCLUSÕES | 40 |
| REFERÊNCIAS | 41 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 - PROTEÍNAS PARTICIPANTES DA HOMEOSTASE DO FERRO | 5 |
| TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DE PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA AVANÇADA COM (CASOS) E SEM (CONTROLES) HEMOSSIDEROSE HEPÁTICA PRÉ-TRANSPLANTE | 21 |
| TABELA 3 - ETIOLOGIA DA DOENÇA HEPÁTICA EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE HEPÁTICO COM (CASOS) E SEM (CONTROLES) HEMOSSIDEROSE HEPÁTICA PRÉ-TRANSPLANTE | 21 |
| TABELA 4 - GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA DA DEPOSIÇÃO DE FERRO NO TECIDO HEPÁTICO | 24 |
| TABELA 5 - ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS NOS ESPÉCIMES DE BIOPSIA DO ENXERTO HEPÁTICO NO PÓS-TRANSPLANTE PRECOCE (1 MÊS) EM 41 PACIENTES COM (CASOS) E SEM (CONTROLES) HEMOSSIDEROSE HEPÁTICA PRÉ-TRANSPLANTE | 29 |
| TABELA 6 - ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS NOS ESPÉCIMES DE BIOPSIA DO ENXERTO HEPÁTICO NO PÓS-TRANSPLANTE TARDIO (\cong 2 ANOS) EM 35 PACIENTES COM (CASOS) E SEM (CONTROLES) HEMOSSIDEROSE HEPÁTICA PRÉ-TRANSPLANTE | 31 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------|--|----|
| FIGURA 1 - | CASO 6: EXPLANTE HEPÁTICO DE PACIENTE COM FENÓTIPO CLÁSSICO DE HH (IFH 4,9; C282Y-/- H63D-/-) APRESENTANDO HEMOSSIDEROSE INTENSA (4+) (COLORAÇÃO DE PERLS, X 225) | 29 |
| FIGURA 2 - | CASO 23: PRESENÇA DE HEMOSSIDEROSE EM HEPATÓCITOS PERI-PORTAIS NO FÍGADO DO DOADOR (COLORAÇÃO DE PERLS X 225) | 30 |
| FIGURA 3 - | CASO 34: PACIENTE PORTADOR DE CIRROSE ALCOÓLICA E FENÓTIPO MZ PARA α 1-ANTITRIPSINA (C282Y-/- H63D +/-), RECEBEU 16 UNIDADES DE CONCENTRADO DE HEMÁCIAS NO PRIMEIRO MÊS PÓS-TRANSPLANTE. A) AUSÊNCIA DE HEMOSSIDEROSE NA BIÓPSIA DO ENXERTO HEPÁTICO 3,5 SEMANAS APÓS O TRANSPLANTE. B) HEMOSSIDEROSE ENVOLVENDO HEPATÓCITOS E CÉLULAS DE KUPFFER NAS ZONAS 1 E 3 NA BIÓPSIA DO ENXERTO HEPÁTICO 2,5 ANOS APÓS O TRANSPLANTE (COLORAÇÃO DE PERLS X 225) | 33 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| Dcytb | Redutase férrica presente na membrana apical do enterócito |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| ERF | Elemento responsivo ao ferro |
| <i>HFE</i> | Gene da hemocromatose hereditária |
| HFE | Proteína codificada pelo gene <i>HFE</i> |
| HH | Hemocromatose hereditária |
| IFH | Índice de ferro hepático |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| PRF | Proteínas reguladoras do ferro |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| RNA _m | RNA mensageiro |
| RTf | Receptor da transferrina |
| Tf | Transferrina |
| TMD-1 | Transportador de metal divalente 1 |
| TH | Transplante hepático |

RESUMO

Poucos são os dados disponíveis a respeito do acúmulo de ferro no enxerto hepático em pacientes submetidos a transplante hepático (TH), nos quais se encontra intensa sobrecarga de ferro no fígado nativo. Realizou-se estudo retrospectivo para avaliar a frequência e distribuição celular de ferro corável em espécimes de biopsia do enxerto hepático, obtidos no período pós-TH precoce e tardio, em pacientes submetidos ao primeiro TH apresentando sobrecarga de ferro no explante, com o propósito de testar a hipótese de que a hemossiderose hepática pré-TH está associada à deposição de ferro no enxerto hepático. Foram comparados os padrões de coloração para ferro em espécimes de biopsia do enxerto hepático obtidas aproximadamente 1 mês (precoce) e 1 a 2 anos (tardio) após TH em 41 pacientes com índice de ferro hepático $> 1,9$ no explante (casos) com um grupo selecionado, em idêntico número, de controles pareados, sem hemossiderose no explante. Os casos incluíam 6 pacientes com diagnóstico pré-TH de hemocromatose hereditária e 35 com cirrose e sobrecarga de ferro secundária. Avaliou-se a presença de ferro na biopsia hepática do doador e o número de unidades de concentrado de hemácias transfundidas no período perioperatório. Depósito precoce de ferro foi encontrado com frequência semelhante nos casos e nos controles (41% vs. 27%, $p = 0,29$), leve e afetando comumente células de Kupffer nos dois grupos. Apesar dos 41 casos terem recebido no período perioperatório maior número de concentrado de hemácias do que os controles (22,3 vs. 16,2; $p = 0,04$), não houve associação entre número total de unidades transfundidas e presença ou ausência de depósito de ferro no pós-TH precoce ($p = 0,72$). Observou-se associação entre a presença de ferro no fígado do doador e depósito de ferro no enxerto hepático no pós-TH precoce ($p = 0,001$). Amostras de biopsias do enxerto hepático de 35 pares (casos/controles) foram estudadas para depósito tardio de ferro, constatando-se presente em 43% dos casos vs. 17% dos controles ($p = 0,06$). Semelhante à fase precoce, o depósito de ferro foi leve e predominou em células de Kupffer. Concluindo, o presente estudo mostrou que o depósito de ferro no período precoce pós-TH foi comum e correlacionou-se com a presença de ferro no fígado do doador, independentemente da existência ou não de hemossiderose hepática pré-TH. Embora tenha havido tendência a pacientes com hemossiderose intensa pré-TH apresentarem maior frequência de acúmulo de ferro nas biopsias tardias, essa não foi estatisticamente significativa. O predomínio de depósito de ferro nas células de Kupffer na fase tardia sugere formas secundárias de sobrecarga de ferro.

LIVER ALLOGRAFT IRON ACCUMULATION IN PATIENTS WITH AND WITHOUT PRETRANSPLANT HEPATIC HEMOSIDEROSIS

ABSTRACT

There is a paucity of data regarding hepatic allograft iron accumulation in patients undergoing orthotopic liver transplantation (OLT) in whom severe iron overload was present in the native explanted liver. To test the hypothesis that pre-OLT hepatic hemosiderosis is associated with iron deposition in the hepatic allograft after OLT, we conducted a retrospective case-control study to evaluate the frequency and cellular distribution of stainable iron in early and late post-OLT hepatic allograft biopsy specimens from patients undergoing their first OLT who had excess iron in their native explanted liver. We compared iron-staining patterns in hepatic allograft biopsy specimens at approximately 1 month (early) and 1 to 2 years (late) post-OLT in 41 patients with hepatic iron indices greater than 1.9 in the explanted liver (cases) with a selected group of matched controls without explant hemosiderosis. Our cases included 6 patients with a pre-OLT diagnosis of hereditary hemochromatosis and 35 patients with cirrhosis and secondary iron overload. Donor liver biopsy specimens were assessed for iron deposition and number of red blood cell (RBC) units transfused in the perioperative period were recorded. Mild early iron deposition was seen with similar frequency in cases and controls (41% v 27%, $p = 0.29$), and commonly affected Kupffer's cells in both groups. Although the 41 cases have received more RBC units in the perioperative period than controls (22,3 v 16,2; $p = 0.04$), there was no association between total RBC units transfused and presence or absence of early iron deposition ($p = 0.72$). There was an association between iron in the donor liver and early hepatic allograft iron deposition ($p = 0.001$). Liver samples from 35 matched pairs were studied for late iron deposition and stainable iron was present in biopsy specimens from 43% cases and 17% controls ($p = 0.06$). Similar to early iron deposition stainable iron was mild and predominantly distributed in Kupffer's cells. In conclusion, our study showed that iron deposition in early post-OLT hepatic allograft biopsy specimens was common and correlated with the presence of iron in the donor liver, whether pre-OLT hepatic hemosiderosis existed or not. Although, there was a trend that patients with severe pre-OLT hepatic hemosiderosis had a greater frequency of stainable iron in late hepatic biopsy specimens, this was not statistically significant. The predominance of iron in Kupffer's cells in late hepatic allograft biopsy specimens suggests secondary forms of iron overload.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o crescente interesse a respeito do papel do ferro nas doenças hepáticas tem estimulado número considerável de pesquisas. Segundo elemento mais abundante na crosta terrestre, o ferro participa de inúmeros processos metabólicos nas células e organismos, sendo essencial para a manutenção da vida. Necessário para o crescimento e desenvolvimento celular, torna-se tóxico quando em quantidades excessivas, particularmente ao fígado, que se constitui no principal receptáculo do metal nas condições de sobrecarga. Concentrações elevadas de ferro no tecido hepático podem resultar em lesão hepatocelular, fibrose e cirrose (BACON; BROWN, 1996; BONKOVSKY et al., 1996; PIETRANGELO, 1998; BONKOVSKY; LAMBRECHT, 2000).

Um clássico exemplo de associação entre sobrecarga de ferro e doença hepática é a hemocromatose hereditária (HH), perturbação herdada por traço autossômico recessivo e que se caracteriza pela absorção intestinal anormalmente elevada de ferro, a despeito de reservas corporais adequadas ou aumentadas do metal (McLAREN et al., 1991; BACON; TAVIL, 1996). Da absorção aumentada na mucosa intestinal resultam depósitos crescentes do metal em diferentes órgãos. O acúmulo de ferro leva à insuficiência progressiva dos órgãos afetados, particularmente fígado, coração e pâncreas, sendo que a expressão fenotípica da doença varia amplamente na dependência de fatores genéticos e não genéticos (BEUTLER et al., 2002; BRITTON et al., 2002). *HFE*, o gene que se apresenta defectivo na maioria dos casos com fenótipo típico de HH, foi identificado em 1996 por FEDER et al. O produto do gene *HFE* é uma glicoproteína transmembrana, homóloga às proteínas do complexo maior de histocompatibilidade classe I, a qual requer interação com a β_2 -microglobulina para transporte intracelular e expressão na superfície celular. Estudos realizados em diferentes

populações demonstraram que 60% a 100% dos pacientes com fenótipo clássico da HH são homozigotos para a mutação do gene *HFE* que resulta na substituição da cisteína pela tirosina no aminoácido de posição 282 (C282Y) (BEUTLER et al., 1996; FEDER et al., 1996; JAZWINSKA et al., 1996; BARTON et al., 1997; CARELLA et al., 1997; THE UK HAEMOCHROMATOSIS CONSORTIUM, 1997; SANCHEZ et al., 1998). Embora o papel exato da proteína HFE no processo de absorção intestinal do ferro ainda não esteja plenamente esclarecido, estudos recentes sugerem que ela, ao interagir com os receptores de transferrina, possa participar no processo através do qual as células das criptas duodenais percebem os estoques corporais do metal (SALTER-CID et al., 1999; FEDER et al., 1998; GROSS et al., 1998).

Graus variáveis de sobrecarga de ferro no tecido hepático são também encontrados em pacientes com doença hepática crônica não associada à HH. Embora a hemossiderose nessas circunstâncias seja habitualmente leve, alguns pacientes cirróticos sem HH desenvolvem intensa sobrecarga de ferro no tecido hepático (DEUGNIER et al., 1997; COTLER et al., 1998; FIEL et al., 1999; LUDWIG et al., 1997).

Aceita-se o TH como tratamento de eleição nos portadores de doença hepática avançada, associando-se a elevados índices de sobrevida. Com o prolongamento da sobrevida pós-TH torna-se relevante o estudo de possíveis fatores que possam afetar o enxerto, sendo um deles o depósito de ferro. Poucas informações existem a respeito do acúmulo de ferro no enxerto de pacientes com sobrecarga hepática de ferro na fase pré-transplante, pois os estudos disponíveis são ainda escassos, usualmente envolvendo número pequeno de pacientes e com seguimento de curto prazo (PILLAY et al., 1991; FARRELL et al., 1994; POULOS; BACON, 1996; PRATSCHKE et al., 1998). Além disso, fatores como a ocorrência de mutações no gene *HFE*, a presença de ferro no fígado do doador, a quantidade de hemotransfusões recebidas no período peri e pós-

transplante e a potencial mobilização de ferro para o enxerto, estocado em outros tecidos, têm sido considerados de forma incompleta. Estudo recente publicado sob a forma de resumo por MAGGIONI e FURTH (1999) sugere que a deposição de ferro no enxerto é mais propensa a ocorrer em pacientes com hemossiderose no fígado nativo. Os autores especularam que tal fenômeno seria devido à redistribuição dos estoques aumentados de ferro presentes na época do transplante (MAGGIONI; FURTH, 1999).

1.1 OBJETIVO

Com o propósito de testar a hipótese de que a presença de hemossiderose hepática pré-transplante está associada com a deposição ulterior de ferro no enxerto hepático após o TH, realizou-se estudo retrospectivo para avaliar a presença e o padrão de distribuição celular de depósito de ferro em espécimes de biopsia hepática obtidos no período pós-transplante precoce e tardio, em pacientes submetidos a TH por doença hepática crônica avançada acompanhada ou não de sobrecarga de ferro no fígado nativo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AVANÇOS NA COMPREENSÃO DA HOMEOSTASE DO FERRO

2.1.1 Absorção Intestinal

O ferro é fundamental para o crescimento e desenvolvimento celular. Duas propriedades químicas tornam o ferro essencial: a habilidade em interagir com o oxigênio e a existência de mais de um estado oxidativo (Fe^{++} e Fe^{+++}). Devido a sua reatividade química, o ferro tem papel importante no transporte de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, atuando como co-fator de muitas enzimas essenciais e no transporte de oxigênio nos mamíferos. Paradoxalmente, essa reatividade química torna-o potencialmente tóxico ao organismo, pois ao catalisar a conversão de peróxido de hidrogênio em radicais livres faculta a formação de poderosos oxidantes capazes de lesar as membranas celulares, proteínas e DNA (BACON; BROWN, 1996; BONKOVSKY; LAMBRECHT, 2000). Isso justifica porque nos sistemas biológicos, o ferro existe apenas transitoriamente como cátion livre. Para que o ferro seja mantido em forma solúvel e não tóxica, mas facilmente disponível às necessidades do organismo, várias proteínas ligam ou incorporam o metal à sua estrutura. Duas proteínas têm papel relevante na manutenção da homeostase do ferro no organismo: a transferrina, que mantém o ferro em estado não tóxico durante seu transporte pelo sangue e no fluido extracelular e a ferritina, principal forma de armazenamento do metal nos tecidos (SEARLE et al., 1994).

Embora pequenas quantidades de ferro sejam eliminadas nas células descamadas e secreções, o organismo não dispõe de mecanismo fisiológico eficiente para a excreção do ferro em excesso. Portanto, as reservas orgânicas do metal se mantêm dentro de limites aceitáveis através da estreita regulação da absorção intestinal, determinada principalmente pela quantidade total de ferro corporal. Outro fator que influencia na regulação da absorção do ferro é a taxa de eritropoese (BACON; BROWN, 1996; ANDREWS, 1999; POWELL et al., 1999).

Nos últimos anos, a identificação e estudo de novas proteínas envolvidas na absorção de ferro no intestino e pelas células somáticas contribuíram significativamente para a compreensão de como os humanos mantêm a homeostase desse elemento (tabela 1) (GUNSHIN et al., 1997; VULPE et al., 1999; DONOVAN et al., 2000; NICOLAS et al., 2001; PARKKILA et al., 2001; MATTMAN et al., 2002; PHILPOTT, 2002).

TABELA 1 - PROTEÍNAS PARTICIPANTES DA HOMEOSTASE DO FERRO

| PROTEÍNAS | FUNÇÃO |
|--------------------------------------|--|
| Dcytb | Redutase férrica na membrana apical do enterócito/ Participa na captação do ferro luminal |
| TMD-1 | Transportador de metal divalente (Fe++) na membrana apical do enterócito/ Captação do ferro luminal |
| Ferritina | Armazenador de ferro no citosol |
| Ferroportina-1 | Transportador de ferro na membrana basolateral do enterócito/ Exportação de ferro para circulação |
| Hefaestina | Ferroxidase na membrana basolateral do enterócito/ Oxida o ferro que então se liga à transferrina circulante |
| Transferrina (Tf) | Proteína transportadora do ferro na circulação |
| Receptor da transferrina (RTf), RTf2 | Presente nas membranas celulares, a endocitose do RTf + transferrina diférrica provê ferro para as necessidades celulares |
| Hepcidina | Expresso pelos hepatócitos, atua como proteína sinalizadora dos estoques corporais de ferro para as células das criptas do intestino delgado |
| HFE | Interage com o RTf influenciando na captação do ferro associado à Tf nas células da cripta duodenal |

FONTE: PHILPOTT, 2002.

A maior parte do ferro dietético se apresenta sob a forma não-heme, como nos vegetais, nos quais se encontra ligado a fitatos. Enquanto o ferro-heme, derivado principalmente das carnes vermelhas e vísceras, é rapidamente absorvido através da borda em escova dos enterócitos, o ferro não-heme, presente na quase totalidade na forma férrica [Fe (III)], necessita antes ser reduzido para Fe (II) para que possa ser captado.

O movimento do ferro presente na luz intestinal, através do epitélio, para a circulação envolve um processo ativo e está restrito à membrana plasmática apical dos enterócitos maduros e diferenciados presentes no topo das vilosidades. Para ser

eficientemente captado pelo enterócito, o ferro dietético [Fe (III)] é transformado em Fe (II) pela ação da redutase férrica designada de Dcytb (*duodenal cytochrome b*) presente na borda em escova das referidas células (McKIE et al., 2001). O transporte do ferro Fe (II) através da membrana apical do enterócito é então realizado pelo transportador de metais divalentes, o TMD-1, cuja expressão é regulada na razão inversa da concentração intracelular de ferro (GUNSHIN et al., 1997; ANDERSON; POWELL, 1999). Diferentes autores demonstraram recentemente a expressão aumentada desse transportador de metal na mucosa duodenal em modelo murino de HH, bem como em pacientes portadores de HH (FLEMING et al., 1999; ZOLLER et al., 1999; GRIFFITHS et al., 2001; ZOLLER et al., 2001). Além de presente na membrana apical das células absorptivas intestinais, o TMD-1 também se expressa nos endossomas que estão sendo reciclados nas células somáticas, aonde pode facilitar a captação do ferro ligado à transferrina (PHILPOTT, 2002).

Após a captação, o ferro não-heme, em conjunto com o ferro liberado do complexo ferro-protoporfirina, se incorporam ao mesmo reservatório intracitoplasmático, podendo ser armazenados sob a forma de ferritina e eliminados gradualmente com a descamação das células senescentes, ou transportados através da membrana basolateral do enterócito para a circulação sanguínea de acordo com as necessidades corporais. Pelo menos duas proteínas, a ferroportina-1 e hephaestina, estão envolvidas na exportação de ferro para a circulação através da membrana basolateral dos enterócitos (VULPE et al., 1999; DONOVAN et al., 2000; PARKKILA et al., 2001; ZOLLER et al., 2001). A ferroportina-1 atua como transportador transmembrana de ferro (II) e se expressa fortemente na superfície basolateral dos enterócitos maduros da vilosidades bem como nos hepatócitos, sinciciotrofoblastos da placenta e células reticuloendoteliais do fígado e baço (ABBOUD; HAILE, 2000; McKIE et al., 2000; PHILPOTT, 2002). Para que seja exportado para a circulação através da membrana basolateral do enterócito o Fe (II) deve ser oxidado em Fe (III), tarefa executada pela hephaestina, proteína transmembrana, homóloga à ceruloplasmina, com atividade de

ferroxidase (VULPE et al, 1999). Presume-se que enquanto a ferroportina-1 transporta o ferro ferroso para fora do enterócito, a hephaestina oxida-o em ferro férrico o qual se liga avidamente à transferrina circulante (PARKKILA et al., 2001). Nos tecidos, a transferrina diférrica liga-se aos receptores da transferrina (RTf) presente nas células, e o complexo sofre processo de endocitose, provendo ferro para as necessidades celulares (MORGAN, 1996).

Os mecanismos precisos através dos quais os estoques corporais de ferro e sua demanda no processo eritropoese influenciam o processo de absorção intestinal e, por conseguinte, a sua homeostase estão sendo progressivamente elucidados. Sabe-se que a capacidade dos enterócitos maduros das vilosidades captarem e transportarem o ferro é determinada grandemente pelas necessidades corporais de ferro na fase em que estão sendo formados nas criptas intestinais. Evidências sugerem que a concentração de ferro nas células das criptas de Lieberkühn funciona como um mecanismo de percepção dos estoques corporais de ferro e é um importante determinante da sua absorção intestinal. As células das criptas captam o ferro ligado à transferrina circulante através da membrana basolateral e, de acordo com a concentração intracelular, irão modular a capacidade absorptiva dos enterócitos maduros (ANDERSON, 1996; ANDERSON; POWELL, 1999; ANDREWS, 1999). Células especializadas na captação e exportação de ferro, como os enterócitos e os macrófagos no fígado e baço, dispõem de mecanismos reguladores intracelulares que as permite responder aos sinais oriundos dos tecidos formadores de sangue e do fígado, onde o ferro é estocado. Um destes mecanismos consiste na regulação pós-transcricional da expressão gênica das proteínas envolvidas na absorção do ferro através das ação das proteínas reguladoras do ferro (PRF). PRF são proteínas citoplasmáticas que se ligam ao RNA mensageiro (RNAm) que contém um elemento responsivo ao ferro (ERF) na sua região não codificadora. Tais proteínas existem sob a forma ativa e inativa no citosol, sendo que suas proporções relativas dependem da quantidade intracelular de ferro. Sob condições de depleção de ferro no citosol, as PRF são expressas na forma ativa

ligando-se aos ERF, alterando a expressão de diferentes proteínas envolvidas no processo de absorção do ferro. Assim, os níveis de ferro nas células das criptas determinam a atividade das PRF as quais modulam a expressão de genes das proteínas envolvidas na homeostase desse elemento. Um aspecto interessante é que a função das PRFs também pode ser alterada pela inflamação e estresse oxidativo (PARKILLA et al., 2001).

Postula-se que tecidos formadores de sangue como a medula óssea e locais de armazenamento de ferro como o fígado sejam capazes de transmitir sinais para as células das criptas intestinais, talvez sob a forma de moléculas sinalizadoras (PARKKILA et al., 2001; PHILPOTT, 2002). Uma potencial proteína sinalizadora foi recentemente identificada e designada hepcidina (NICOLAS et al., 2001). Expressa exclusivamente em hepatócitos, seus níveis de RNAm encontram-se elevados nos modelos murinos de sobrecarga de ferro de origem dietética e genética (PIGEON et al., 2001; PHILPOTT, 2002). NICOLAS et al. (2002) demonstraram que a expressão gênica desse peptídeo é regulada pela presença de anemia, hipoxia e inflamação, sugerindo sua participação em condições fisiopatológicas que cursem com deficiência ou sobrecarga de ferro.

Outra descoberta relevante para o estudo da absorção intestinal do ferro é a recente identificação do gene *HFE*, presente no braço curto do cromossoma 6, cuja mutação está implicada na maioria dos casos de HH (FEDER et al., 1996). Esse gene, inicialmente designado *HLA-H* e posteriormente, *HFE*, codifica uma glicoproteína transmembrana, homóloga às proteínas do complexo maior de histocompatibilidade classe I. A HFE apresenta 3 domínios ou cadeias extra-celulares (α_1 , α_2 e α_3), uma região transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática. O domínio extracelular α_3 associa-se de forma não-covalente à β_2 -microglobulina (LEBRON; BJORKMAN, 1999; POWELL; YAPP, 2000). A interação com a β_2 -microglobulina é essencial para o processamento intracelular eficiente e expressão apropriada dessa proteína na superfície celular.

Em 1996, FEDER et al. demonstraram a presença de uma mutação no gene *HFE* (*G745A*) a qual leva à substituição da cisteína por tirosina na posição 282 (C282Y) em 83% dos indivíduos com fenótipo para HH analisados. Inúmeros estudos posteriores confirmaram a descoberta da presença do estado de homozigoto para a mutação C282Y em 60% a 100% dos pacientes com diagnóstico de HH (BEUTLER et al., 1996; JAZWINSKA et al., 1996; BARTON et al., 1997; CARELLA et al., 1997; SANCHEZ et al., 1998; THE UK HAEMOCHROMATOSIS CONSORTIUM, 1997). No Brasil, segundo BITTENCOURT et al. (2002) a prevalência de homozigotos para mutação C282Y em portadores de HH é de 53%.

A mutação C282Y rompe a ponte dissulfeto, importante para a manutenção da estrutura terciária da proteína HFE, impedindo sua associação com a β_2 -microglobulina, bem como sua expressão na membrana celular. A proteína mutante permanece retida no retículo endoplasmático e compartimento médio do Golgi aonde não consegue sofrer processamento adequado e sendo por isto objeto de degradação acelerada (FEDER et al., 1997; WAHEED et al., 1997).

O sequenciamento completo do gene *HFE* identificou uma segunda mutação (*C187G*) que resulta na substituição da histidina em aspartato na posição 63 (H63D) da proteína HFE. Ao contrário da mutação C282Y, a mutação H63D não impede a associação da proteína HFE com a β_2 -microglobulina. A mutação H63D aumenta o risco relativo de desenvolvimento de HH em indivíduos que são heterozigotos para a mutação C282Y, sendo encontrado o genótipo heterozigoto composto C282Y/H63D em 4% dos pacientes com HH (FEDER et al., 1996). Tal genótipo tende a produzir formas clínicas mais brandas que as observadas nos pacientes homozigotos para C282Y (BEUTLER et al., 1996; FEDER et al., 1996; BACON, 1997). A constatação de que alguns pacientes com fenótipo típico de HH não apresentam quaisquer das mutações C282Y e H63D sugere a possibilidade de que outras mutações possam estar envolvidas na patogênese da HH (BRITTON et al., 2002). Recentemente, outras mutações no gene *HFE* e nos genes que codificam a ferroportina-1 e o receptor da

transferrina-2 foram encontrados em casos de sobrecarga de ferro em indivíduos não portando as mutações clássicas do gene *HFE* (BARTON et al., 1999; De VILLIERS et al., 1999; MURA et al., 1999; PIPERNO et al., 2000; ASBERG et al., 2002; DEVALIA et al., 2002; GIRELLI et al., 2002; MATTMAN et al., 2002; WALLACE et al., 2002).

A estreita correlação entre o gene *HFE* e a instalação da HH foi elegantemente demonstrada por ZHOU et al. (1998) ao desenvolverem um modelo experimental para HH. Estudando camundongos que não expressam o gene *HFE* os autores observaram que tais animais apresentaram níveis elevados de saturação da transferrina e aumento dos depósitos de ferro nos hepatócitos, indicando que um defeito no gene *HFE* resulta no acúmulo excessivo de ferro. Evidências adicionais da importância dos complexos *HFE*/ β_2 -microglobulina no metabolismo de ferro foram fornecidas por estudos realizados em camundongos que não expressam o gene da β_2 -microglobulina. Tais animais apresentam absorção aumentada de ferro na mucosa intestinal, níveis elevados de ferro plasmático e saturação da transferrina, e desenvolvem sobrecarga de ferro predominantemente nos hepatócitos, lembrando o fenótipo observado nos pacientes com HH (De SOUZA et al., 1994; ROTHENBERG; VOLAND, 1996; SANTOS et al., 1996).

Estudos imuno-histoquímicos demonstraram que a *HFE* é expressa em algumas células epiteliais ao longo de todo tubo digestivo. Diferente dos padrões observados em outros segmentos do tubo digestivo, a expressão da *HFE* no intestino delgado limita-se às células das criptas das vilosidades, nas quais se localiza na região intracelular perinuclear. A localização estratégica da *HFE* nas células das criptas aliada à demonstração que o complexo *HFE*/ β_2 -microglobulina se expressa na membrana celular em associação com os receptores da transferrina (RTf) sugerem que *HFE* poderia estar envolvida na pré-determinação da capacidade absorptiva das células intestinais antes dessas migrarem para o topo das vilosidades (PARKKILA et al., 1997). Evidências crescentes indicam que a interação da *HFE* com o TRf é capaz de

influenciar a captação de ferro dependente dos RTfs (SALTER-CID et al., 1999; FEDER et al., 1998; GROSS et al., 1998; PARKKILA et al., 2001). Postula-se que a proteína HFE selvagem age facilitando a captação de ferro circulante mediada pelo RTf nas células das criptas intestinais; tal ação estaria suprimida na HH associada à proteína HFE mutante pela perda dessa função facilitadora. Este conceito é sustentado pela recente observação *in vivo* que a captação duodenal de ferro ligado à transferrina plasmática está prejudicada em camundongos que não expressam o gene *HFE* (TRINDER et al., 2002).

2.1.2 Transporte e Armazenamento do Ferro nos Tecidos

Uma vez alcançando a corrente sanguínea, o ferro é transportado na quase totalidade ligado à transferrina, glicoproteína sintetizada no fígado e que apresenta dois sítios conhecidos de ligação para o metal (Fe^{+++}). Além disso, ferro não ligado à transferrina (ferro de baixo peso molecular) pode ser encontrado na circulação, particularmente em condições nas quais exista sobrecarga do metal e quando todos os sítios de ligação da transferrina já tenham sido ocupados. Grande parte do ferro não ligado à transferrina circula como férrico (Fe^{+++}) em combinação com citrato, que é rapidamente captado pelos hepatócitos (BONKOVSKY et al., 1996).

A maioria do ferro que é captado pelas células somáticas encontra-se inicialmente ligado à transferrina circulante e sua captação ocorre através da interação da transferrina com os RTfs presentes na membrana celular. O maior determinante da deposição do ferro nos tecidos é, portanto, a distribuição desses receptores na membrana das células. Os precursores eritróides e os trofoblastos da placenta, por exemplo, apresentam número elevado de RTfs e, portanto, maior capacidade de captação do ferro. A reação entre a transferrina e seu receptor é reversível, pH-dependente e influenciada pelo conteúdo de ferro da transferrina. Em pH fisiológico no meio extracelular, o receptor apresenta maior afinidade pela transferrina diférrica quando comparada à transferrina

monoférrica, o que assegura a máxima eficiência na captação do metal. Na maior parte das células a transferrina diférrica liga-se ao RTf e todo o complexo Tf-RTf sofre endocitose. Entretanto, em algumas células tais como os hepatócitos, o ferro possivelmente possa ser liberado da transferrina ainda na superfície da membrana plasmática (MORGAN, 1996). Exposto ao pH ácido do endossoma, o Fe^{+++} é liberado da transferrina e o complexo apotransferrina/RTf é reciclado para a superfície celular. Então, no pH levemente básico do fluido extracelular a apotransferrina se dissocia do RTf e o processo pode iniciar novamente. O Fe^{+++} liberado da transferrina deve ser novamente reduzido (Fe^{++}) para posteriormente ser transportado possivelmente pelo TMD-1 através da membrana do endossoma (PHILPOTT, 2002).

A maior parte do ferro estocado se armazena sob a forma de ferritina, com distribuição predominantemente hepática, nos músculos e nas células do sistema reticuloendotelial. Cada molécula de ferritina é capaz de carrear até 4 500 átomos de ferro. Em condições fisiológicas pequena quantidade de ferro se armazena sob a forma de hemossiderina, depósito insolúvel no qual o metal se associa a quantidades variáveis de proteína desnaturada, possivelmente resultante da polimerização da ferritina. Tanto a ferritina como a hemossiderina fornecem ferro acessível à produção de hemoglobina, embora a mobilização a partir da hemossiderina seja relativamente lenta (SEARLE et al., 1994).

2.2 O FÍGADO E O METABOLISMO DO FERRO

Por exercer diversas funções metabólicas dependentes do ferro, pela posição estratégica na captação do metal absorvido no enterócito e transportado pela circulação portal, o fígado representa a sede mais importante do metabolismo do ferro e, por isto, está sujeito a alterações estruturais e funcionais que decorrem do acúmulo desse elemento.

Os hepatócitos e as células de Kupffer desempenham papéis distintos no metabolismo do ferro. As células de Kupffer, como integrantes do sistema reticulo-endotelial, estão envolvidas na recuperação e reciclagem do ferro oriundo dos eritrócitos lesados ou senescentes, especialmente em condições patológicas, auxiliando na manutenção do suprimento constante e adequado de ferro para produção de hemoglobina e outras proteínas e enzimas dependentes do ferro. As células de Kupffer também captam ferro coloidal, p. ex. ferro dextran, com resultante aumento na síntese de ferritina (SEARLE et al., 1994; YOUNG; AISEN, 1994).

Os hepatócitos sintetizam e secretam transferrina, captam a transferrina associada ou não ao ferro e liberam ferro para a apotransferrina plasmática. Além disso, essas células sintetizam ferritina e captam ferritina e ferro não ligado à transferrina presentes no plasma. Contrariando conceito antigo de que as células do sistema reticuloendotelial, incluindo as células de Kupffer, seriam o principal sítio de armazenamento do ferro a longo prazo, sabe-se hoje que os hepatócitos compartilham e talvez respondam pela maior parte dessa função. Os hepatócitos são um receptáculo importante de ferro; em condições de sobrecarga de ferro, grande parte do excesso de ferro corporal é encontrado no fígado. Apesar da transferrina constituir provavelmente a principal fonte de ferro para o fígado, os hepatócitos podem utilizar ferro derivado da captação da heme-pexina, hemoglobina-haptoglobina, lactoferrina, ferritina e ferro de baixo peso molecular (YOUNG; AISEN, 1994).

Uma fonte importante de lactoferrina são os neutrófilos, os quais degranulam nos locais de inflamação. A lactoferrina contida nos grânulos das células é liberada provavelmente para seqüestrar o ferro nas áreas circunjacentes. O seqüestro de ferro inibe o crescimento de células estranhas e minimiza a injúria tecidual causada pela formação de radicais livres catalisada pelo ferro. Embora muita da lactoferrina liberada possa ser removida localmente pelos macrófagos, o restante da proteína que escapa ao clareamento local é encaminhado para o fígado através da circulação. Ali a lactoferrina é captada pelas células endoteliais e células de Kupffer, degradada e o

ferro depositado sob a forma de ferritina. A deposição hepática de ferro derivada da lactoferrina tem sido sugerida como potencial mecanismo para sobrecarga hepática de ferro em doenças inflamatórias. A ferritina é também liberada pelas células nos locais de inflamação, sendo o hepatócito responsável pelo clareamento da ferritina tecidual da circulação. A ferritina captada pelos hepatócitos pode ser digerida pelos lisossomas e o ferro pode ser reutilizado, se necessário, na ferritina recém-sintetizada. Condições de sobrecarga intensa de ferro, como por exemplo talassemia e HH, podem levar à saturação da transferrina sérica e ao aparecimento de ferro de baixo peso molecular na circulação. Esse ferro é também removido pelos hepatócitos e podem contribuir para sobrecarga de ferro no fígado e outros órgãos (YOUNG; AISEN, 1994).

2.3 SOBRECARGA DE FERRO NAS DOENÇAS HEPÁTICAS AVANÇADAS

Normalmente o ferro não é histologicamente visível, mesmo com o uso de técnicas especiais de coloração (TURLIN; DEUGNIER, 2002). Hemossiderose ou simplesmente siderose se define como a presença de ferro corável nos tecidos sob a forma de hemossiderina, sem qualquer consideração quanto à etiologia ou intensidade do processo. Também, por convenção, o termo hemossiderose é usado para espécimes que contêm apenas ferritina corável (LUDWIG; BATTS, 1998).

Em intensidade variável, a ocorrência de sobrecarga de ferro é freqüente em pacientes cirróticos, podendo estar associada ou não à HH. A presença de hemossiderose hepática em pacientes com hepatopatia crônica não relacionada a HH já foi descrita há várias décadas (TUTLE et al., 1959; SCHAEFER et al., 1962; SABESIN; THOMAS, 1964; WILLIAMS et al., 1967; KENT; POPPER, 1968). Um dos métodos mais empregados na identificação da hemossiderose em espécimes de biopsia hepática é a coloração de Perls com azul da Prússia pela qual o ferro insolúvel (hemossiderina) cora em azul (TURLIN; DEUGNIER, 2002). Enquanto a deposição de ferro no tecido hepático na HH é tipicamente hepatocelular, com predomínio na

região periportal, nas formas de sobrecarga secundária o ferro tende a se acumular nas células de Kupffer. Nos casos de intensa hemossiderose, o ferro pode se depositar também nas células de Kupffer dificultando a distinção entre HH e causas secundárias de sobrecarga do metal. Além de caracterizar o padrão de distribuição celular, a avaliação histológica permite a graduação semiquantitativa dos depósitos de ferro (SEARLE et al, 1994; DEUGNIER et al., 1997).

A determinação bioquímica da concentração de ferro no tecido hepático pode ser feita pelos métodos de colorimetria ou espectrofotometria de massa por absorção atômica (TURLIN; DEUGNIER, 2002). Os resultados obtidos utilizando-se amostras de tecido a fresco ou oriundos de blocos desparafinados são equivalentes (OLYNYK et al., 1994). O índice de ferro hepático (IFH), resultante da concentração de ferro no tecido hepático expressa em micromoles por grama de tecido seco dividida pela idade do paciente em anos, foi inicialmente desenvolvido para auxiliar na diferenciação entre os homozigotos portadores de HH e os heterozigotos e os portadores de cirrose alcoólica (BASSETT et al., 1986). Embora no estudo inicial o achado de IFH > 1,9 tenha sido apontado como diagnóstico de HH, estudos subseqüentes demonstraram que intensa sobrecarga de ferro, em níveis semelhantes ao encontrados na HH (IHF > 1,9) pode ocorrer em pacientes com cirrose de outras etiologias (DEUGNIER et al., 1997; LUDWIG et al., 1997; COTLER et al., 1998; FIEL et al., 1999).

A identificação do *HFE* e das mutações associadas à maioria dos casos de HH ampliou o arsenal de métodos diagnósticos disponíveis na investigação dos pacientes com hepatopatia crônica e sobrecarga de ferro. Estudos recentes, examinando a prevalência das mutações do *HFE* em pacientes com doença hepática avançada e hemossiderose, de moderada a intensa no explante hepático, encontraram índices de 0% a 20% de prevalência do estado de homozigoto para C282Y (MINGUILLAN et al., 1997; FIEL et al., 1999; BRANDHAGEN et al., 2000; KOWDLEY et al, 2000; STUART et al., 2000). A partir dos dados disponíveis na

literatura é possível concluir que em um número expressivo de pacientes cirróticos com níveis séricos e teciduais elevados de ferro, a sobrecarga de ferro não está associada à mutação C282Y do gene *HFE*.

Vários são os fatores que podem contribuir para a instalação de hemossiderose hepática na presença de doença hepática crônica avançada não associada à HH tais como anemia com eritropoese inefetiva, hiperesplenismo e hemólise, múltiplas transfusões sanguíneas, suplementação excessiva de ferro, elevado teor de ferro em algumas bebidas alcoólicas, “shunts” cirúrgicos portossistêmicos e “shunts” intra-hepáticos espontâneos e atividade inflamatória no tecido hepático (TISDALE, 1961; GRACE; BALINT, 1966; NIXON, 1966; ECKER et al., 1968; BAKER; COHEN, 1972; CONN, 1972; LOMBARD; STRAUCHEN, 1981; CAPRON et al., 1986; Di BISCEGLIE et al., 1992; ADAMS et al., 1994; YOUNG; AISEN, 1994). Alguns investigadores sugerem que o ferro não ligado à transferrina, presente no sangue portal, pode contribuir para o desenvolvimento de sobrecarga de ferro no fígado, visto que é captado pelos hepatócitos de forma preferencial e eficiente. Na cirrose ocorre um excesso de ferro não ligado à transferrina devido à redução da síntese da transferrina e ao aumento do nível sérico de ferro resultante da necrose hepatocelular, hemólise e outros fatores (BRISSOT et al., 1985; DEUGNIER et al., 1997). Segundo PASCOE et al. (1999), a anemia de células espiculadas pode contribuir como causa de sobrecarga de ferro em alguns pacientes com cirrose de etiologia alcoólica.

2.4 ACÚMULO DE FERRO NO ENXERTO HEPÁTICO DE PACIENTES COM HEMOSSIDEROSE HEPÁTICA PRÉ-TRANSPLANTE

Poucas informações existem a respeito do acúmulo de ferro no enxerto de pacientes com sobrecarga hepática de ferro na fase pré-TH, pois os estudos disponíveis são ainda escassos, usualmente envolvendo número pequeno de pacientes, com seguimento de curto prazo, e trazendo resultados controversos. POWELL (1992)

revisou conjuntamente a experiência dez centros no TH de 22 portadores de HH. Em todos os casos nos quais se mensurou a ferritina sérica e a saturação de transferrina, estes índices caíram para os valores normais em 6 meses após o TH e assim permaneceram durante o período de acompanhamento médio de 32 meses. O estudo das biopsias pós-TH com coloração especial para ferro realizado em 8 pacientes com sobrevida variando de 13 a 66 meses foi normal. Nos quatro dos 8 pacientes nos quais se mediu a concentração de ferro no tecido do enxerto hepático, a mesma revelou-se normal. PILLAY et al. (1991) não encontraram evidência de depósito de ferro em biopsias hepáticas pós-TH de 5 pacientes com fenótipo clássico de HH submetidos a TH (intervalo entre TH e biopsias variou de 6 meses a 5 anos). PRATSCHKE et al. (1998) avaliando 4 pacientes com HH não encontraram evidência de reacúmulo de ferro nas biopsias do enxerto hepático 1 ano após-TH. Outro estudo recentemente publicado também falhou em demonstrar reacúmulo de ferro no enxerto hepático após intervalo médio de 47 meses após TH em 4 indivíduos homozigotos para a mutação C282Y (STUART et al., 2000). Uma explicação para tais resultados negativos seria o curto espaço de tempo que decorre do TH pois pacientes com HH presente desde o nascimento não apresentam sobrecarga de ferro clinicamente significativa antes da segunda ou terceira década de vida (POWELL, 1992).

Entretanto, resultados preliminares publicados por FAGIOULI et al. (1993) a respeito da experiência da Universidade de Pittsburgh no TH de portadores de HH, demonstraram a ocorrência de acúmulo de ferro no enxerto em 10 pacientes com HH que foram a óbito no pós-TH. Resultados preliminares de FIEL et al. (1993) a respeito da avaliação de 8 dos 14 pacientes com HH submetidos a TH demonstraram depósito de ferro precoce e significativo no enxerto já nos primeiros 3,5 meses pós-TH, embora não tenham discriminado o padrão de distribuição celular do ferro. FARRELL et al. (1994) encontraram a presença de hemossiderose hepatocelular em espécimes de biopsia do enxerto hepático de 5 dos 7 pacientes com HH avaliados entre 8 e 110 dias após o TH. Três dos cinco pacientes com hemossiderose no enxerto tinham recebido

grande quantidade de hemoderivados no período perioperatório e apresentavam depósito de ferro em células de Kupffer, sugerindo sobrecarga de ferro secundária. Além das hemotransfusões, outro fator que poderia contribuir para sobrecarga de ferro secundária no enxerto hepático de pacientes com antecedentes de intensa hemossiderose no pré-TH seria a redistribuição dos depósitos preexistentes de ferro, de outros tecidos para o novo fígado (EGAWA et al., 1996).

A possibilidade de que a redistribuição de ferro armazenado em outros tecidos para o fígado possa contribuir para o acúmulo de ferro no enxerto hepático em pacientes com hemossiderose hepática pré-TH foi também levantada por estudo recentemente publicado sob a forma de resumo por MAGGIONI e FURTH (1999). Ao analisar espécimes de biopsia do enxerto hepático de 153 pacientes com cirrose hepática não associada à HH submetidos a TH, os autores encontraram prevalência de 19% de hemossiderose hepatocelular. Os pacientes cujo fígado nativo apresentava sobrecarga de ferro tiveram duas vezes mais probabilidade de desenvolver depósitos de ferro no enxerto. Entretanto, variáveis importantes como o número de hemotransfusões recebidas, presença de mutações no gene *HFE*, presença de ferro no fígado do doador, intervalo de tempo entre a data do transplante e a data da biopsia analisada não foram consideradas.

Portanto, os dados disponíveis a respeito do reacúmulo de ferro no enxerto hepático de portadores de sobrecarga de ferro no fígado nativo, associada ou não à HH, são ainda heterogêneos e por vezes, controversos. Além do número reduzido de pacientes avaliados, o seguimento pós-TH tem sido, muitas vezes, insuficiente, e fatores como número de hemotransfusões recebidas, presença de ferro no fígado do doador, presença de mutações no gene *HFE* têm sido considerados de modo incompleto. Assim, o cenário do comportamento do depósito de ferro no enxerto de pacientes com doença hepática avançada e intensa hemossiderose submetidos a TH apresenta ainda lacunas a serem preenchidas, merecendo estudos ulteriores.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Desenhou-se estudo retrospectivo caso-controle para comparar o acúmulo precoce (1 mês) e tardio (> 1 mês) de ferro em espécimes de biopsia de enxerto hepático de pacientes com doença hepática avançada, submetidos a TH no Programa de Transplante da Clínica Mayo, Rochester, MN. O estudo, desenvolvido entre dezembro de 1998 e agosto de 1999, foi aprovado pelo Institutional Review Board daquela Instituição. O estudo constou de duas etapas: determinação da presença de ferro no enxerto hepático em fase precoce (1 mês após o TH) e tardia (> 1 mês após o TH) em pacientes com sobrecarga de ferro no fígado nativo (casos) e em pacientes transplantados no mesmo período os quais não apresentavam evidência de depósito de ferro corável no fígado nativo (controles). Para a avaliação da presença de ferro no enxerto hepático no pós-transplante tardio foram considerados apenas os casos pareados com seguimento histológico superior a um mês de pós-transplante, com pelo menos um mês de intervalo entre a biopsia selecionada para a avaliação de presença de ferro no enxerto no pós-operatório precoce. Além disso, nessa segunda etapa selecionou-se biopsias hepáticas evolutivas dos pares com tempo de pós-transplante o mais aproximado possível entre o caso e o respectivo controle.

3.2 PACIENTES E MÉTODOS

3.2.1 População Estudada

Foram revisados os espécimes de biopsia dos explantes hepáticos de 682 adultos (idade > 18 anos) que, consecutivamente, se submeteram ao primeiro TH, de

março de 1985 a julho de 1997, no Programa de Transplante Hepático da Clínica Mayo, Rochester, Minnesota, por serem portadores de doença hepática crônica avançada. A presença de hemossiderose no explante hepático foi avaliada pela coloração pelo azul da Prússia. Quando havia evidência de ferro corável no explante, a concentração de ferro no tecido hepático e o índice de ferro hepático (IFH) eram rotineiramente determinados. Quatrocentos e quarenta e sete dos 682 pacientes selecionados tinham participado anteriormente em estudo da ocorrência de hemossiderose na cirrose hepática de diferentes etiologias (LUDWIG et al., 1997). Os critérios para inclusão no presente estudo foram a presença de IFH > 1,9 no explante hepático e a disponibilidade de espécimes de biopsia do enxerto hepático realizada aproximadamente 1 mês após o transplante.

Quarenta e um pacientes com sobrecarga de ferro preencheram os critérios de inclusão e constituíram o grupo de estudo (casos), sendo comparados com 41 controles pareados sem sobrecarga de ferro. A tabela 2 expõe as principais características clínicas e laboratoriais dos casos e controles e a tabela 3 discrimina a etiologia da doença hepática que motivou o transplante nos pacientes que compõem a amostra. Em relação aos fatores predisponentes para sobrecarga secundária de ferro, um paciente foi submetido a esplenectomia por esferocitose hereditária tendo recebido múltiplas hemotransfusões antes do TH, e três foram submetidos a derivação portossistêmica cirúrgica vários anos antes do TH (dois derivação esplenorrenal e um derivação porto-cava). Excluindo-se o paciente com esferocitose hereditária, nenhum outro caso apresentava antecedentes de ter recebido mais de 15 unidades de concentrado de hemácias antes do TH.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DE PACIENTES COM DOENÇA HEPÁTICA AVANÇADA COM (CASOS) E SEM (CONTROLES) HEMOSSIDEROSE HEPÁTICA PRÉ-TRANSPLANTE

| VARIÁVEIS | CASOS (N=41) | CONTROLES (N=41) | P |
|--|---------------------|------------------|------------------------|
| Idade (anos) ⁽¹⁾ | 50(27-69) | 46 (25-66) | 0,34 ⁽³⁾ |
| Sexo (homens/mulheres) | 37/4 | 33/8 | 0,28 ⁽⁴⁾ |
| Escore de Child-Pugh-Turcotte ⁽¹⁾ | 10(5-13) | 9 (5-13) | 0,04 ⁽³⁾ |
| Etiologia da doença hepática | | | |
| Cirrose biliar | 3 | 2 | 1,0 ⁽⁴⁾ |
| Cirrose não-biliar | 38 | 39 | |
| Número de unidades de concentrado de hemácias transfundidas ^{(1) (2)} | 22,3(1-85) | 16,2(3-52) | 0,04 ⁽³⁾ |
| Estudos do ferro sérico ⁽¹⁾ | | | |
| Ferro sérico (µg/dl) | 158(52-312) | 90(21-235) | <0,0001 ⁽³⁾ |
| Índice de saturação (%) | 94(40-100) | 36(8-99) | <0,0001 ⁽³⁾ |
| Ferritina sérica (µg/l) | 870(148-12 935) | 127(12-1 720) | <0,0001 ⁽³⁾ |
| CFH (µg/g tecido seco) | 9 295(3 614-28 284) | NR | |
| IFH | 3,8(2,0-10,1) | NR | |

FONTE: O autor

NOTA: CFH, concentração de ferro no tecido hepático; IFH, índice de ferro hepático; NR, não realizado; TH, transplante hepático.

(1) Dados expressos como mediana (variação).

(2) Intervalo desde a cirurgia do transplante até o primeiro mês pós-TH.

(3) Teste de Wilcoxon.

(4) Teste de McNemar baseado nos pares discordantes.

TABELA 3 - ETIOLOGIA DA DOENÇA HEPÁTICA EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE HEPÁTICO COM (CASOS) E SEM (CONTROLES) HEMOSSIDEROSE HEPÁTICA PRÉ-TRANSPLANTE

| ETIOLOGIA DA DOENÇA HEPÁTICA | CASOS (N = 41) | CONTROLES (N = 41) |
|---|----------------|--------------------|
| VHC | 4(1 VHC+DHA) | 4 |
| VHB | 2 | 3 |
| Doença hepática alcoólica | 9(1 DHA+A1AT) | 8 |
| CBP/CEP | 1/2 | 1/1 |
| Doença de Wilson | 1 | 0 |
| Hepatite autoimune | 1 | 4 |
| Deficiência de α -1 antitripsina | 6 | 4 |
| Criptogênica | 9 | 16 |
| Hemocromatose hereditária | 6(2 HH+A1AT) | 0 |

FONTE: O autor

NOTA: VHC, vírus da hepatite C; VHB, vírus da hepatite B; DHA, doença hepática alcoólica; CBP, cirrose biliar primária; CEP, colangite esclerosante primária; A1AT, deficiência de α -1 antitripsina; HH, hemocromatose hereditária.

Testes genéticos para as mutações C282Y e H63D foram disponíveis em 38 (93%) dos 41 casos com sobrecarga de ferro no explante hepático. Quatro dos 6 indivíduos com diagnóstico pré-TH de HH eram homozigotos para a mutação C282Y

e enquanto dois não apresentavam nenhuma das duas mutações pesquisados no gene *HFE*. Um deles era um homem de 47 anos de idade, cujo explante apresentava cirrose com sobrecarga de ferro, com distribuição predominantemente hepatocelular (concentração de ferro no tecido hepático 12 731 µg/g tecido seco; IFH 4,9, figura 1), portador de insuficiência cardíaca congestiva classe IV, submetido a transplante combinado de coração e fígado, ocasião em que se constatou intensa deposição de ferro no miocárdio e fígado (SURAKOMOL et al., 1997). O outro paciente era um homem de 50 anos de idade com cirrose hepática e diabetes melito o qual apresentou o mais elevado grau de hemossiderose hepática entre os casos estudados (concentração de ferro no tecido hepático 28 284 µg/g tecido seco e IHF 10,1), com distribuição de ferro predominantemente hepatocelular, e sem que qualquer justificativa para sobrecarga de ferro fosse identificada. Nos outros 32 casos, sete eram heterozigotos para a mutação C282Y, oito heterozigotos para a mutação H63D e dezessete não apresentavam quaisquer das mutações pesquisadas. Nenhum caso de heterozigoto composto (C282Y/H63D) ou homozigoto para H63D foi identificado.

3.2.2 Grupo Controle

Cada paciente incluído no estudo, com sobrecarga de ferro no explante, foi o mais adequadamente possível pareado, de acordo com idade, sexo, etiologia da doença hepática (cirrose biliar *versus* cirrose não-biliar e, se possível, entidades da mesma etiologia) com um grupo controle composto de pacientes submetidos ao primeiro TH durante o mesmo período, os quais não apresentavam ferro corável no explante hepático. Os controles tinham disponível um espécime de biopsia do enxerto hepático realizada cerca de um mês do pós-transplante.

3.2.3 Dados Clínicos

Revisados os prontuários médicos, os seguintes dados foram coletados: idade na época do TH, sexo, etiologia da doença hepática, grau de disfunção hepática de acordo com a classificação de CHILD-PUGH modificada (CHILD; TURCOTTE, 1964), número de unidades de papa de hemácias transfundidas durante o procedimento de transplante e até o primeiro mês após e os resultados dos testes genéticos para as mutações do gene *HFE* (C282Y e H63D), quando disponíveis.

3.2.4 Exames Laboratoriais

Conforme rotina do Serviço, as determinações da concentração de ferro, saturação da transferrina e ferritina têm sido realizadas em amostras de soro coletadas dos pacientes estudados, após período de jejum de 12 horas, durante o processo de avaliação pré-transplante nos Laboratórios da Clínica Mayo, Rochester, utilizando técnicas padrão. Os valores de referência na população adulta para ferro sérico são 50-150 µg/dl (homens) e 35-145 µg/l (mulheres), para saturação de transferrina-14% a 50% e, para ferritina é 20-300 µg/l (homens) e 20-120 µg/l (mulheres).

3.2.5 Avaliação Histológica

Amostras de tecido obtido do explante hepático bem como do enxerto hepático foram fixadas em solução de formalina 10%, processadas e incluídas em blocos de parafina. Os cortes histológicos corados pela coloração azul-da-prússia de Perls foram revisados pela autora e por um patologista (Kenneth P. Batts), sem conhecimento da identidade e dos dados clínicos e bioquímicos dos pacientes. A distribuição celular do ferro corável (hepatócitos, epitélio dos ductos biliares e células de Kupffer) foi assinalada e pontuada segundo escala de graduação de 0 a 4 (SEARLE et al., 1994) (tabela 4).

TABELA 4 - GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA DA DEPOSIÇÃO DE FERRO NO TECIDO HEPÁTICO

| GRAU | ASPECTO DOS GRÂNULOS A MAGNIFICAÇÃO DO MICROSCÓPIO NECESSÁRIA PARA IDENTIFICAÇÃO |
|------|--|
| 0 | Grânulos ausentes ou identificados com dificuldade em aumento de 400X |
| 1+ | Pouco discerníveis em aumento de 250X porém facilmente confirmados em 400X |
| 2+ | Pequenos grânulos são identificados em aumento de 100X |
| 3+ | Pequenos grânulos são identificados em aumento de 25X |
| 4+ | Massas de depósitos de ferro são identificados em aumento de 10X ao a olho nu |

FONTE: SEARLE et al., 1994

Os espécimes de biopsia hepática dos doadores, disponíveis em 39 pacientes, foram analisados pela coloração de Perls para determinar a presença ou não de ferro.

3.2.6 Quantificação do Ferro no Tecido Hepático

A determinação da concentração de ferro hepático em amostras de tecido do explante incluídas em blocos de parafina foi realizada por espectrofotometria de massa por absorção atômica (Perkin Elmer Sciex Corp., Norwalk, CT, ELAN 6000, ICP-MS, inductively coupled Plasm Cell Spectrometer) (BUSH & MOYER, 1998, HOUK, 1986). Todo o processo foi realizado em sala especialmente preparada para quantificação de metais no Laboratório de Metais da Clínica Mayo. O valor normal da concentração de ferro no tecido hepático, no Laboratório da Clínica Mayo, é de 200 a 2 400 $\mu\text{g/g}$ de tecido seco (ts) para homens e de 200 a 1 600 $\mu\text{g/g}$ tecido seco para mulheres. O IHF se calcula dividindo-se a concentração de ferro no tecido hepático ($\mu\text{g/g}$ tecido seco) pela idade do paciente expressa em anos, multiplicado por 55,8. O valor normal do IHF deve ser inferior a $1\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{idade}^{-1}$ (em anos).

3.2.7 Teste genético para as Mutações do Gene *HFE*

Preliminarmente, a análise das mutações do *HFE* foram disponíveis em 38 dos 41 casos com hemossiderose no explante hepático, tendo sido realizada como parte de um estudo prévio (BRANDHAGEN et al., 2000). As mutações do gene *HFE* foram avaliadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), seguida de digestão por

enzimas de restrição, segundo FEDER et al, 1996. O DNA foi extraído de células precipitadas obtidas antes do TH em 27 casos e de amostras de tecido hepático congelado em 11 casos. O DNA foi extraído de células precipitadas usando-se o kit de isolamento de DNA Purogene (Gentra System, Inc., Minneapolis, MN, USA) enquanto para a extração do DNA do tecido hepático empregou-se um protocolo padrão de digestão com proteinase K na presença de um tampão de lise seguido por extração com fenol/clorofórmio. O DNA foi ressuspensão em tampão tris EDTA (10mmol/l Tris e 1 mmol/l EDTA, pH 8,0), quantificado por espectrofotometria e sua concentração ajustada para 0,25 µg/µl. O DNA foi examinado para as mutações C282Y e H63D utilizando-se dois pares de oligonucleotídeos iniciadores (FEDER et al., 1996). Para cada par de oligonucleotídeo iniciador 250 ng de DNA foram amplificados em uma reação contendo volume total de 25 µl na presença de 10 picomoles de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 200 mmol/l de cada um dos fosfodinucleotídeos (dNTP), 50 mmol/l de KCl, 10 mmol/l de Tris pH 8,3, 1,5 mmol/l de MgCl₂, 0,001% de gelatina e 0,625 unidades de Taq Polimerase (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os parâmetros de ciclagem da PCR foram 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, repetidos em 30 ciclos. As amostras foram mantidas a 72°C por 10 minutos para completar a reação.

As mutações foram identificadas pela digestão de produtos de PCR com endonucleases de restrição de acordo com as orientações da empresa produtora das enzimas (New England BioLabs, MA, USA). As enzimas *Rsa I* e *Dpn II* foram usadas para detectar as mutações C282Y e H63D, respectivamente. Os produtos da digestão foram submetidos a eletroforese em gel com concentração de 3% (1% agarose, 2% NuSieve GTG) e observados sob luz ultravioleta, depois de corados com brometo de etídeo. O padrão de migração resultante permitiu a identificação de cada amostra como sendo homozigota para a sequência selvagem, heterozigota ou homozigota para cada uma das mutações.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos aplicados foram selecionados de acordo com a distribuição das variáveis e seu caráter dependente ou correlacionado, considerando a natureza dos dados constituída por medidas pareadas entre indivíduos dos grupos caso e controle, com nível mínimo de significância de 5%.

Desta forma, para avaliar a diferença entre as medianas no conjunto de variáveis dependentes de distribuição assimétrica como, por exemplo, idade, número de concentrados de hemácias transfundidos e intervalo de tempo entre a data do TH e a das biopsias realizadas, utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas. Para avaliar as possíveis diferenças entre as variáveis categóricas pareadas e nominais como a presença de ferro no fígado do doador e nos espécimes de biopsia do enxerto hepático, foi aplicado o teste de McNemar, baseado nos pares discordantes entre os grupos caso e controle. Tratando-se de variáveis categóricas, independentes e ordinais foi utilizado o Teste do Qui-Quadrado para tendências lineares (graduação do ferro corável nas biopsias do enxerto hepático no pós-TH precoce); para variáveis categóricas, independentes e nominais como por exemplo a distribuição celular do ferro corável empregou-se o Teste exato de Fisher, considerando o tamanho da amostra ($n < 100$).

A análise de Regressão Logística para amostra dependente ou pareada foi utilizada para avaliar os resultados da coloração de ferro (espécimes de biopsia hepática do pós-TH precoce, e separadamente, espécimes de biopsia do pós-TH tardio) ajustando o modelo para as possíveis variáveis confundidoras como presença de ferro no fígado do doador, intervalo de tempo entre a data do TH e data das biopsias, número de concentrado de hemácias transfundidas.

A amostra foi estimada considerando um erro do tipo I máximo de 5% (alfa) e erro tipo II máximo de 10% (beta), obtendo um poder de teste de 85% a 95% com a

amostra selecionada de 82 casos ou 41 pares. Na avaliação das biopsias na fase tardia do pós-TH, incluindo somente 35 pares, o poder do teste foi de 80%.

O pacote estatístico empregado nas análises foi o SAS (The SAS statistical package) (SAS General. SAS Institute Inc., SAS® User's Guide: Basics, Version 5 ed. Cary, NC: SAS Institute Inc, 1985).

4 RESULTADOS

4.1 DEPÓSITO DE FERRO NOS ESPÉCIMES DE BIOPSIA DO ENXERTO HEPÁTICO NO PERÍODO PÓS-TRANSPLANTE PRECOCE

Os achados histopatológicos nos espécimes de biopsia hepática dos casos e controles, obtidos no pós-TH precoce estão demonstrados na tabela 5. A mediana do intervalo de tempo entre a cirurgia do TH e a data da biopsia hepática foi 22 dias nos dois grupos ($p = 0,53$). Dezesete dos 41 casos com sobrecarga de ferro (41%) e 11 dos 41 controles (27%) apresentavam ferro corável nos espécimes de biopsia hepática no pós-TH precoce ($p = 0,29$). Entre os pacientes com hemossiderose precoce, o depósito de ferro ocorreu predominantemente nas células de Kupffer. A deposição de ferro ocorreu isoladamente nas células de Kupffer em 13 casos e em combinação com depósitos hepatocelulares em 4 casos. Em 13 dos 17 casos, o depósito de ferro foi graduado como discreto (1+), enquanto em 4 casos, foi pontuado como 2+. Todos os casos de hemossiderose hepatocelular foram graduados como discretos. Não se observou diferença estatisticamente significativa no depósito de ferro precoce entre os 6 casos com diagnóstico clínico pré-TH de HH e os 32 casos com hemossiderose secundária no explante ($p = 0,66$). A distribuição celular de ferro nos controles foi similar aos casos com depósito de ferro, ocorrendo mais comumente nas células de Kupffer que nos hepatócitos ($p = 0,67$). Entretanto, houve diferença estatisticamente significativa na graduação semiquantitativa do ferro corável na biopsia precoce entre casos e controles ($p < 0,01$), com maior depósito nos casos (tabela 5).

FIGURA 1 -CASO 6: EXPLANTE HEPÁTICO DE PACIENTE COM FENÓTIPO CLÁSSICO DE HH (IFH 4,9; C282Y-/- H63D-/-) APRESENTANDO HEMOSSIDEROSE INTENSA (4+). (COLORAÇÃO DE PERLS, X 225)

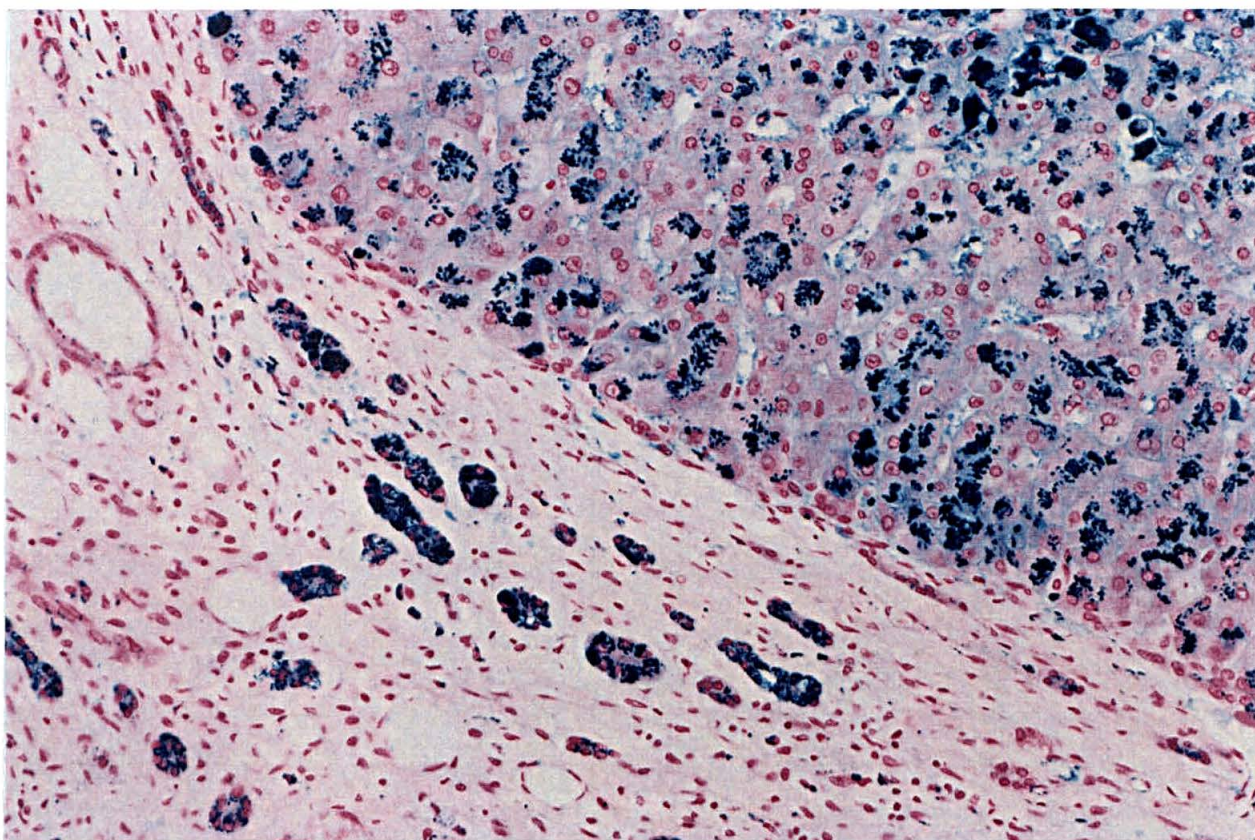


TABELA 5 - ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS NOS ESPÉCIMES DE BIÓPSIA DO ENXERTO HEPÁTICO NO PÓS-TRANSPLANTE PRECOCE (1 MÊS) EM 41 PACIENTES COM (CASOS) E SEM (CONTROLES) HEMOSSIDEROSE HEPÁTICA PRÉ-TRANSPLANTE

| CARACTERÍSTICAS | CASOS (N = 41) | CONTROLES (N = 41) | P |
|--|----------------|--------------------|----------------------|
| Intervalo entre o TH e a biópsia (dias) | 22(14-102) | 22(18-79) | 0,53 ⁽¹⁾ |
| Doador com biópsia hepática (+) para coloração de ferro | 12/39 (31) | 8/39 (21) | 0,63 ⁽²⁾ |
| Presença de ferro corável na biópsia do enxerto hepático | 17/41 (41) | 11/41 (27) | 0,29 ⁽²⁾ |
| Entre os receptores com ferro corável na biópsia do enxerto: | | | |
| Coloração de ferro no doador ⁽³⁾ | | | 0,68 ⁽⁴⁾ |
| Positiva | 12/17(71) | 8/11(73) | |
| Negativa | 5/17(29) | 2/11(18) | |
| Distribuição celular do ferro corável | | | 0,67 ⁽⁴⁾ |
| Células de Kupffer | 13/17(76) | 7/11(64) | |
| Células de Kupffer + hepatócitos | 4/17(24) | 4/11(36) | |
| Graduação do ferro hepático ⁽⁵⁾ | | | <0,01 ⁽⁶⁾ |
| Traços | 0(0) | 8/11(73) | |
| 1+ | 13/17(76) | 3/11(27) | |
| 2+ | 4/17(24) | 0(0) | |

NOTA: Valores expressos como mediana (variação) ou número (porcentagem).

⁽¹⁾ Teste de Wilcoxon.

⁽²⁾ Teste de McNemar baseado nos pares caso/controle discordantes.

⁽³⁾ Coloração para ferro no doador não estava disponível em um dos pacientes do grupo controle.

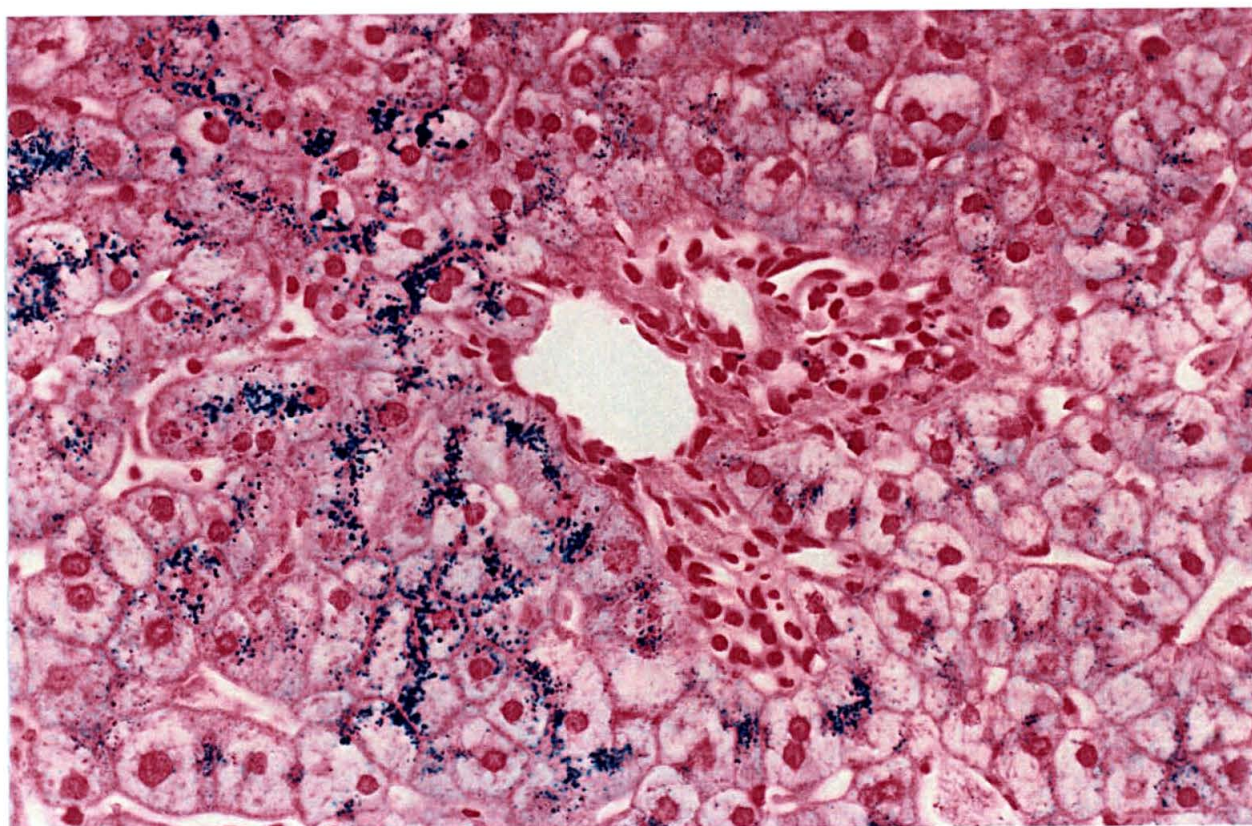
⁽⁴⁾ Teste exato de Fisher.

⁽⁵⁾ Baseado na escala de 0 a 4+ (SEARLE et al., 1994).

⁽⁶⁾ Teste do Qui-quadrado para tendências lineares.

Espécimes de biopsia hepática do doador eram disponíveis para avaliação de ferro corável em todos os 41 casos e em 39 dos 41 controles. Conforme demonstra a tabela 5, a frequência de ferro corável no fígado dos doadores dos casos e controles foi semelhante em ambos. Observou-se associação entre a presença de ferro no fígado do doador e depósito de ferro no enxerto hepático no pós-TH precoce ($p = 0,001$). Especificamente, todos os 20 pacientes (12 casos e 8 controles) que receberam fígado com evidência de hemossiderose ainda apresentavam ferro nos espécimes de biopsia obtida aproximadamente 1 mês após TH. Por outro lado, apenas 7 dos 60 pacientes (5 casos e 2 controles) cujo doador não apresentava hemossiderose hepática desenvolveram deposição de ferro durante o mesmo intervalo de tempo. A figura 2 ilustra a presença de ferro corável na biopsia hepática de um dos doadores avaliados.

FIGURA 2 - CASO 23: PRESENÇA DE HEMOSSIDEROSE EM HEPATÓCITOS PERIPORTAIS NO FÍGADO DO DOADOR (COLORAÇÃO DE PERLS X 225)



Empregando-se modelo de regressão logística para análise entre casos e controles em relação à presença de ferro no enxerto hepático no período pós-TH precoce ajustado para a data do TH, intervalo de tempo entre a cirurgia e a data da biopsia e presença de ferro corável no fígado do doador não encontrou diferença estatisticamente significativa (casos v controles, $p = 0,15$). Apesar dos 41 casos terem recebido número maior de unidades de concentrado de hemácias durante a cirurgia do transplante e no primeiro mês pós-TH que os controles (22,3 v 16,2; $p = 0,04$), nenhuma associação entre o número total de unidades de concentrado de hemácias transfundidas e presença ou ausência de ferro corável no enxerto no pós-transplante precoce foi detectada ($p = 0,72$).

4.2 DEPÓSITO DE FERRO NOS ESPÉCIMES DE BIOPSIA DO ENXERTO HEPÁTICO NO PERÍODO PÓS-TRANSPLANTE TARDIO

Trinta e cinco pares de casos e controles apresentaram espécimes de biopsia do enxerto após 1 mês do TH disponíveis para análise de depósito tardio de ferro. Seis pares de casos e controles foram excluídos devido a seguimento histológico insuficiente motivado por óbito (4 pacientes com sobrecarga de ferro e 2 pacientes do grupo controle). A tabela 6 relaciona os achados histopatológicos das biopsias hepáticas tardias dos casos e controles. A mediana do intervalo de tempo entre o TH e a biopsia hepática tardia nos casos e controles foi respectivamente 648 dias (variação, 62 a 3 717 dias) e 413 dias (variação, 54 a 4 144 dias), com $p = 0,76$.

TABELA 6 - ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS NOS ESPÉCIMES DE BIOPSIA DO ENXERTO HEPÁTICO NO PÓS-TRANSPLANTE TARDIO (≥ 2 ANOS) EM 35 PACIENTES COM (CASOS) E SEM (CONTROLES) HEMOSSIDEROSE PRÉ-TRANSPLANTE

| CARACTERÍSTICAS | CASOS (N = 35) | CONTROLES (N = 35) | P |
|---|----------------|--------------------|---------------------|
| Intervalo entre o TH e a biopsia (dias) | 648(62-3 717) | 413(54-4 144) | 0,76 ⁽¹⁾ |
| Pacientes com ferro corável na biopsia | 15/35 (43) | 6/35 (17) | 0,06 ⁽²⁾ |
| Entre os pacientes com ferro corável na biopsia | | | |
| Distribuição celular do ferro corável | | | 1,0 ⁽³⁾ |
| Células de Kupffer | 9/15(60) | 3/6(50) | |
| Células de Kupffer + hepatócitos | 6/15(40) | 3/6(50) | |
| Graduação do ferro hepático ⁽⁴⁾ | | | 1,0 ⁽³⁾ |
| 1+ | 11/15(73) | 5/6(83) | |
| 2+ | 4/15(27) | 1/6(17) | |

NOTA: Valores expressos como mediana (variação) ou número (porcentagem)

⁽¹⁾ Teste de Wilcoxon.

⁽²⁾ Teste de McNemar baseado nos pares caso/controle discordantes.

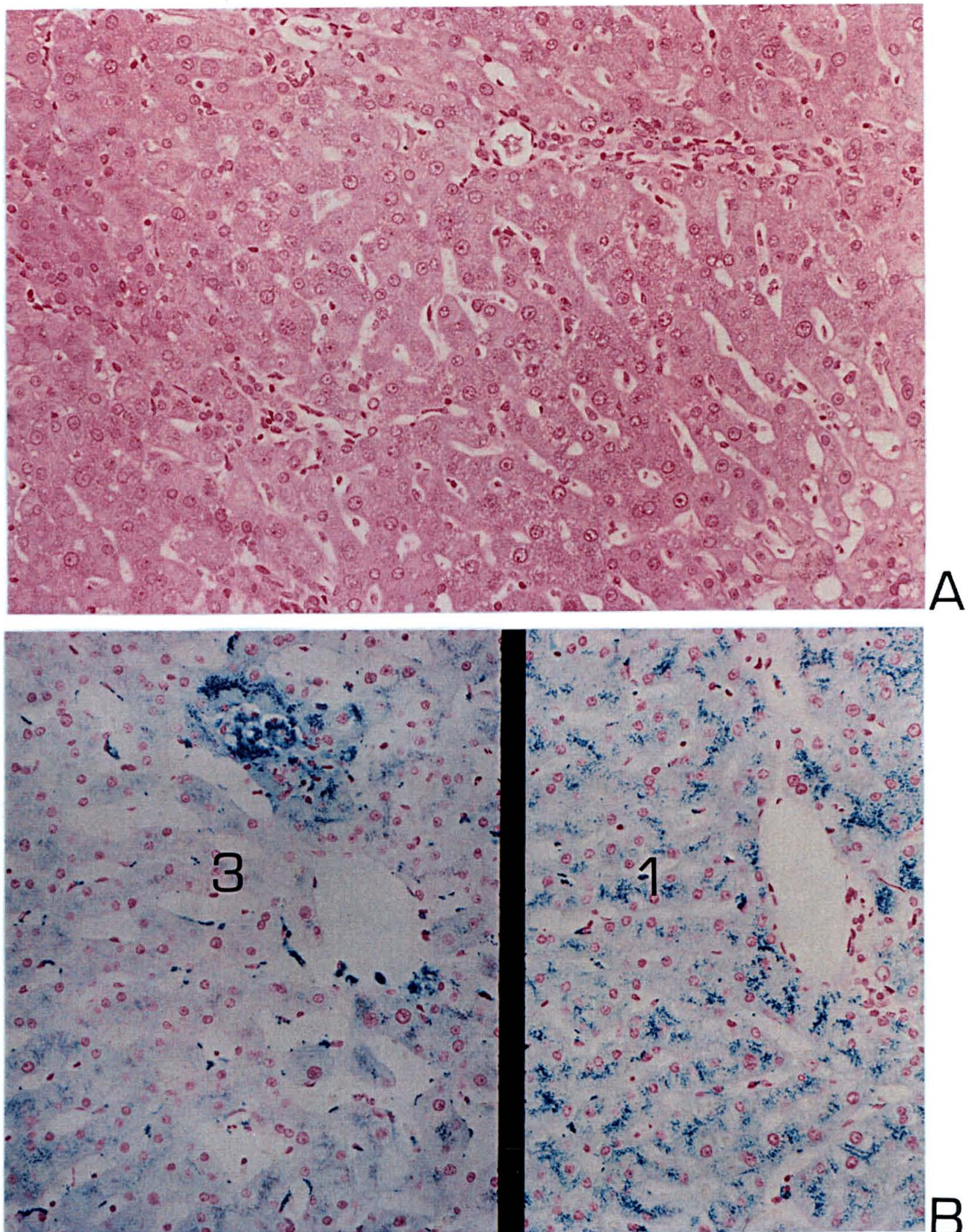
⁽³⁾ Teste exato de Fisher.

⁽⁴⁾ Baseado numa escala de 0 a 4+ (SEARLE et al., 1994).

Ao analisar as biopsias obtidas no pós-TH tardio observou-se tendência a associação entre o depósito de ferro no enxerto hepático e a presença de hemossiderose no pré-TH ($p = 0,06$). Especificamente, o ferro corável foi identificado nos espécimes de biopsia tardia no enxerto hepático em 15 dos 35 casos (43%) comparado com apenas 6 dos 35 controles (17%). Pelo resultado não estatisticamente significativo da análise das biopsias obtidas no pós-TH tardio quanto à associação entre depósitos de ferro no enxerto hepático e a presença de hemossiderose pré-TH, por recomendação do estatístico, foi realizada simulação com a inclusão de apenas um caso positivo à amostra estudada. O resultado foi a queda de p para 0,04, o que permite sugerir que o nível de significância de 6% se deva ao tamanho insuficiente da amostra. Portanto, só se poderá inferir que existe associação entre hemossiderose intensa pré-TH e depósito ulterior de ferro no enxerto no pós-TH tardio com estudos que envolvam maior número de casos. Casos e controles com biopsia hepática tardia disponível receberam número similar de unidades de concentrado de hemácias transfundidas no período perioperatório (mediana, 17,8 v 18,0; $p = 0,13$). Quando ajustado para vários fatores como intervalo entre o TH e a última biopsia, presença de ferro corável no fígado do doador e número de unidades de concentrado de hemácias transfundidas o valor de p permaneceu limítrofe ($p = 0,06$; OR, 3,8; IC = 95%, 0,9 a 15,6)

Semelhante ao observado no período pós-transplante precoce, o ferro corável na fase tardia distribuiu-se predominantemente nas células de Kupffer nos casos e controles (tabela 6). Os 15 casos com hemossiderose nas células de Kupffer foram graduados em 1+ em 11 casos e 2+ em 4 casos. Incluiu-se nesse grupo o caso de um homem de 41 anos submetido a TH por cirrose alcoólica com associação de fenótipo MZ para alfa-1 antitripsina (figura 3). Esse paciente era heterozigoto para a mutação H63D e não apresentava a mutação C282Y. Devido a complicações no período pós-operatório precoce recebeu 16 unidades de papa de hemácias durante o primeiro mês pós-TH. O espécime de biopsia do enxerto hepático obtido 2 anos e meio após o TH revelou hemossiderose hepatocelular e nas células de Kupffer; e concentração de ferro

FIGURA 3 -CASO 34: PACIENTE PORTADOR DE CIRROSE ALCOÓLICA E FENÓTIPO MZ PARA α 1-ANTITRIPSINA (C282Y-/- H63D +/-), RECEBEU 16 UNIDADES DE CONCENTRADO DE HEMÁCIAS NO PRIMEIRO MÊS PÓS-TRANSPLANTE. A) AUSÊNCIA DE HEMOSSIDEROSE NA BIÓPSIA DO ENXERTO HEPÁTICO 3,5 SEMANAS APÓS O TRANSPLANTE. B) HEMOSSIDEROSE ENVOLVENDO HEPATÓCITOS E CÉLULAS DE KUPFFER NAS ZONAS 1 E 3 NA BIÓPSIA DO ENXERTO HEPÁTICO 2,5 ANOS APÓS O TRANSPLANTE (COLORAÇÃO DE PERLS X 225)



no tecido hepático de 6 243 $\mu\text{g/g}$ de tecido seco. A biopsia do fígado do doador e a amostra do enxerto obtida 24 dias após o transplante não apresentaram quaisquer evidências de ferro corável.

Entre os seis controles que apresentavam hemossiderose nos espécimes de biopsia tardia do enxerto hepático, o ferro corável distribuiu-se principalmente nas células de Kupffer, com graduação de 1+ em 5 controles e 2+ em um controle. Três desses 6 controles apresentaram hemossiderose discreta em células de Kupffer e hepatócitos.

Cinco dos 6 pacientes com diagnóstico pré-TH de HH tinham disponível espécime de biopsia tardia do enxerto hepático, para avaliação do depósito de ferro. Ferro corável foi observado em 3 dos cinco pacientes. Em dois casos, o depósito de ferro era discreto (1+) e se restringiu às células de Kupffer. O outro paciente com HH apresentou deposição hepatocelular de ferro leve (1+) em associação com hemossiderose nas células de Kupffer (2+). Três dos quatro pacientes que eram homozigotos para mutação C282Y tiveram enxerto hepático biopsiado aproximadamente 1 ano após o TH. Dois não apresentaram evidência de ferro e em um havia apenas depósito discreto (1+) em células de Kupffer.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo analisou a presença e o padrão de distribuição celular do ferro no enxerto hepático no período precoce e tardio pós-TH em pacientes com e sem hemossiderose intensa pré-TH (IHF > 1,9). A presença de ferro corável no enxerto hepático durante as primeiras semanas foi comum e ocorreu com frequência semelhante nos casos e nos controles ($p = 0,29$). O depósito de ferro no pós-TH precoce não se associou com diagnóstico clínico pré-TH de HH ou à presença de hemossiderose intensa no explante hepático. Tais achados sugerem que durante o período precoce pós-TH o ferro identificado no fígado não resulta da mobilização de outros tecidos para o enxerto hepático, mas ao já presente no fígado do doador, conforme constatação na biopsia nele realizada ($p = 0,001$).

Em contraste, no pós-TH tardio (aproximadamente 2 anos) houve tendência para os pacientes com hemossiderose hepática intensa pré-TH apresentarem maior frequência de ferro corável no enxerto, embora essa possível relação de causa e efeito não possa ser plenamente estabelecida, pelo índice baixo de significância estatística ($p = 0,06$).

O predomínio de ferro nas células de Kupffer nos espécimes de biopsias tardias sugere que possam estar envolvidas formas secundárias de sobrecarga de ferro, como mobilização do armazenado em outros tecidos. No presente estudo, as hemotransfusões não explicaram a potencial diferença entre casos e controles em relação à deposição tardia de ferro no enxerto, tendo em vista que a mediana no número de unidades de papa de hemácias transfundidas foi similar nos dois grupos.

EGAWA et al. (1996) apontaram a mobilização de ferro armazenado em sítios extra-hepáticos como provável fator causal da rápida instalação de hemossiderose hepatocelular, já em fase precoce pós-TH, em uma criança portadora de hemocromatose neonatal. Embora fosse escasso o depósito de ferro corável constatado

na biopsia do enxerto no dia 7 pós-TH, as biopsias subseqüentes, realizadas nos dias 26, 36 e 53 pós-TH, demonstraram hemossiderose progressiva nos hepatócitos e células de Kupffer, alcançando grau 2+ (escala de 0 a 4+) nas células afetadas. Na necropsia, realizada no dia 62 pós-TH, após óbito por arritmia cardíaca, encontrou-se acúmulo de ferro em vários órgãos incluindo o fígado. Apesar da criança haver recebido 12 hemotransfusões (totalizando 400 ml de concentrado de hemácias), o volume depletado pelas freqüentes coletas de sangue para exames e perdas gastrointestinais estimadas alcançou aproximadamente 500 ml e 200 ml respectivamente. Como não existem relatos de aumento na absorção intestinal de ferro na hemocromatose neonatal, o principal fator implicado na hemossiderose no enxerto foi a redistribuição do ferro preexistente em tecidos extra-hepáticos para o fígado.

Recentemente MAGGIONI e FURTH (1999) estudaram a ocorrência de depósito de ferro corável no enxerto de 153 pacientes portadores de cirrose hepática não associada à HH. Segundo os autores, a ocorrência de depósito de ferro no enxerto se associou à presença de hemossiderose hepática pré-TH ($p = 0,06$). Observamos que os autores, entretanto, não descrevem o intervalo entre o TH e a realização da biopsia e tampouco antecedentes de hemotransfusões e presença ou não de ferro no fígado do doador.

Níveis séricos e teciduais de ferro elevados são freqüentemente encontrados em pacientes com doença hepática crônica (CHAPMAN et al., 1982; Di BISCEGLIE et al., 1992; BACON et al., 1994). A maioria desses pacientes tem níveis normais ou discretamente aumentados de ferro no tecido hepático. Recentemente, vários estudos têm documentado sobrecarga de ferro hepático em níveis tipicamente correspondentes à HH, em um número substancial de pacientes com doença hepática avançada não causada pela HH (DEUGNIER et al., 1997; LUDWIG et al., 1997; COTLER et al., 1998; STUART et al., 2000). Estudo prévio realizado na Clínica Mayo demonstrou que 7,5% de 447 explantes hepáticos de receptores de TH com doença hepática avançada, não associada a HH, apresentavam $IHF > 1,9$ (LUDWIG et al., 1997). A

quase totalidade dos pacientes com hemossiderose intensa, avaliados no presente estudo representam formas de sobrecarga de ferro não associadas à mutação C282Y, em conformidade com os dados já existentes na literatura que documentam que a maioria dos casos de sobrecarga de ferro em portadores de doença hepática avançada consistem em formas secundárias de hemossiderose, não relacionados à HH (De KNEGT et al., 1997; MINGUILLAN et al., 1997; FIEL et al., 1999; COTLER et al., 1998; BRANDHAGEN et al., 2000; KOWDLEY et al., 2000; STUART et al., 2000). Portanto, um IFH > 1,9 na presença de cirrose hepática deve ser interpretado com cautela, não constituindo, necessariamente, prova diagnóstica da presença de HH (LUDWIG et al., 1997). Embora a mutação C282Y no gene *HFE* esteja presente na maioria dos portadores de HH, os relatos de pequeno número de pacientes com HH que não carregam tal mutação foram confirmados em dois de nossos casos com fenótipo clássico desse distúrbio do metabolismo do ferro, mas ausência do genótipo típico para HH (FEDER et al., 1996; CARELLA et al., 1997; THE UK HAEMOCHROMATOSIS CONSORTIUM, 1997; BRITTON et al., 2002).

O mecanismo preciso pelo qual o ferro se acumula no fígado cirrótico permanece ainda pouco compreendido e é provavelmente multifatorial. Fatores como absorção aumentada de ferro, elevado teor de ferro em algumas bebidas alcoólicas, deficiências nutricionais (especialmente folato), hiperesplenismo e hemólise, e a presença de “shunts” venosos intra e extra-hepáticos têm sido implicados (SCHAEFER et al., 1962; CONN, 1972; ADAMS et al., 1994). A anemia de células espiculadas ou equinocíticas também tem sido proposta como causa de sobrecarga de ferro em pacientes com doença hepática avançada (PASCOE et al., 1999). No presente estudo, como relatado anteriormente, um paciente foi submetido a esplenectomia por esferocitose hereditária, tendo recebido múltiplas transfusões antes do TH, e 3 pacientes foram submetidos à derivação portossistêmica cirúrgica vários anos antes do TH.

A maior parte dos estudos sobre o acúmulo de ferro no enxerto hepático tem sido em portadores de HH. PILLAY et al. (1991), POWELL (1992) e STUART et al.

(2000) não encontraram evidência de depósito de ferro corável no enxerto hepático em biopsias, realizadas no período pós-TH, em intervalo que variou de 6 meses a 66 meses pós-transplante. Em contraste, resultados preliminares de um estudo desenvolvido por FAGIUOLI et al. (1993) indicaram acúmulo de ferro em todos os 10 pacientes com HH que faleceram após o TH. FARRELL et al. (1994) também encontraram deposição de ferro no enxerto hepático de 5 dos 7 pacientes com HH submetidos a TH em biopsias obtidas entre 8 e 110 dias pós-transplante (FARRELL et al., 1994). Três desses pacientes com apresentação de hemossiderose predominantemente em células de Kupffer tinham recebido grande quantidade de hemoderivados no perioperatório (variação de 23 a 68 unidades), sugerindo sobrecarga de ferro secundária. Todos os 4 pacientes que faleceram apresentavam depósitos de ferro no coração, pâncreas e outros órgãos endócrinos.

Os resultados controversos se devem, possivelmente, a múltiplos fatores como número reduzido de pacientes, acompanhamento muitas vezes insuficiente, presença ou não de mutações no gene *HFE*, número de unidades de concentrado de hemácias transfundidas no perioperatório, presença ou não de ferro no fígado do doador, e efeito ainda desconhecido das drogas imunossupressoras no complexo mecanismo de homeostase do ferro. Aspecto importante, não contemplado em estudos prévios, bem como no presente, diz respeito ao curso clínico no período pós-TH e à função do enxerto na época da realização da biopsia analisada. Muitas das biopsias são indicadas face a alterações de enzimas hepáticas ou disfunções do enxerto. Sabe-se que condições associadas à necrose hepatocelular e inflamação no tecido hepático soem favorecer depósito de ferro corável, independentemente de antecedentes de hemossiderose no fígado nativo.

Neste estudo não foi possível detectar diferença na frequência de ferro corável no enxerto hepático entre pacientes com diagnóstico clínico de HH e pacientes com intensa hemossiderose hepática secundária. O pequeno número de pacientes com HH em nossa casuística e o período de seguimento pós-transplante relativamente curto

(dois anos) limitam consideravelmente nossa habilidade de extrair conclusões definitivas a este respeito. Estudos envolvendo número maior de pacientes com HH submetidos a TH e com período de seguimento mais longo são necessários para avaliar o risco de acúmulo de ferro, a longo prazo, no enxerto hepático em pacientes com HH. A simples comparação do tempo necessário para acúmulo de ferro em pacientes com HH não transplantados, nos quais não ocorre sobrecarga significativa antes da 2ª ou 3ª década de vida, com o que se verifica no enxerto após o transplante hepático não é válida, pois o enxerto é implantado em pacientes com depósitos excessivos de ferro, e a mobilização do ferro estocado em outros órgãos pode representar fator adicional de acúmulo (POWELL, 1992).

6 CONCLUSÕES

1. Depósito de ferro de leve intensidade no período precoce pós-TH é comum e correlaciona-se com a presença de ferro no fígado do doador, sem dependência de existir ou não hemossiderose hepática pré-TH.

2. Não houve diferença estatisticamente significativa na frequência de ferro corável nas biopsias do enxerto no pós-TH tardio entre os pacientes com e sem hemossiderose intensa no pré-TH.

3. O padrão de distribuição celular do ferro nas biopsias do enxerto no pós-TH tardio, predominantemente nas células de Kupffer, sugere formas secundárias de sobrecarga de ferro.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P.C.; BRADLEY, C.; FREI, J.V. Hepatic iron and zinc concentration after portacaval shunting for nonalcoholic cirrhosis. **Hepatology**, v. 19, p. 101-105, 1994.
- ABBOUD, S.; HAILE, D.J. A novel mammalian iron regulated protein involved in intracellular iron metabolism. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 19906-19912, 2000.
- ANDERSON G.J. Control of iron absorption. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 11, p. 1030-1032, 1996.
- ANDERSON, G.J.; POWELL, L.W. Haemochromatosis and control of intestinal iron absorption. **Lancet**, 353, p. 2089-2090, 1999.
- ANDREWS, N.C. Disorders of iron metabolism. **N.E.J. Med.**, v. 341, p. 1986-1995, 1999.
- ASBERG, A.; THORSTENSEN, K.; HVEEM, K.; BJERVE, K.S. Hereditary hemochromatosis: the clinical significance of the S65C mutation. **Genet. Test**, v. 6, p. 59-62, 2002.
- BACON, B.R.; FARAVESH, M.J.; JANNEY, C.G.; NEUSCHWANDER-TERRI, B.A. Non-alcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. **Gastroenterology**, v. 107, p. 1103-1109, 1994.
- BACON, B.R.; BROWN, K.E. Iron metabolism on disorders of iron overload. In: KAPLOVITZ, N. **Liver and biliary diseases**. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. p. 349-362.
- BACON, B.R.; TAVIL, A.C. Hemochromatosis and the iron overload syndromes. In: ZAKIM, D.; BOYER, T.D. (Eds). **Hepatology: a textbook of liver disease**. 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1996. p. 1439-1472.
- BACON, B.R. Diagnosis and management of hemochromatosis. **Gastroenterology**, v. 113, p. 995-999, 1997.
- BAKER, J.A.; COHEN, M. Development of hemosiderosis after side-to-side portacaval shunting. **Gastroenterology**, v. 63, p. 491-494, 1972.
- BARTON, J.C.; SHIH, W.W.R.; SAWADA-HIRAI, R.; ACTON, R.T.; HARMON, L.; RIVERS, C.; ROTHENBERG, B.E. Genetic and clinical description of hemochromatosis probands and heterozygotes: evidence that multiple genes linked to the major histocompatibility complex are responsible for hemochromatosis. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 23, p. 135-145, 1997.
- BARTON, J.C.; SAWADA-HIRAI, R.; ROTHENBERG, B.E.; ACTON, R.T. Two novel missense mutations of the *HFE* gene (I105T and G93R) and identification of the S65C mutation in Alabama hemochromatosis probands. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 25, p. 147-155, 1999.
- BASSET, M.L.; HALLIDAY, J.W.; POWELL, L.E. Value of hepatic iron measurements in early hemochromatosis and determination of the critical iron level associated with fibrosis. **Hepatology**, v. 6, p. 24-29, 1986.
- BEUTLER, E.; GELBART, T.; WEST, C.; LEE, P.; ADAMS, M.; BLACKSTONE, R.; POCKROS, P.; KOSTY, M.; VENDITTI, C.P.; PHATAK, P.D.; SEESE, N.K.; CHORNEY,

K.A.; TEN ELSHOF, A.E.; GERHARD, G.S.; CHORNEY, M. Mutation analysis in hereditary hemochromatosis. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 22, p. 187-194, 1996.

BEUTLER, E.; FELITTI, V.J.; KOZIEL, J.A.; HO, N.J.; GELBART, T. Penetrance of 845→A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in USA. **Lancet**, v. 359, p. 211-218, 2002.

BITTENCOURT, P.L.; PALACIOUS, S.A.; COUTO, C.A.; CANÇADO, E.L.R.; CARRILHO, F.J.; LAUDANNA, A. A.; KALIL, J.; GAYOTTO, L.C.; GOLDBERG, A.C. Analysis of HLA-H antigens and C282Y and H63D mutations of the *HFE* gene in Brazilian patients with hemochromatosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 329-335, 2002.

BONKOVSKY, H.L.; PONKA, P.; BACON, B.R.; DRYSDALE, J.; GRACE, N.D.; TAVILL, A.S. An update on iron metabolism: Summary of the Fifth International Conference on Disorders of Iron Metabolism. **Hepatology**, v. 24, p. 718-729, 1996.

BONKOVSKY, H.L.; LAMBRECHT, R.W. Iron-induced liver injury. **Clin. Liver Dis.**, v. 4, p. 409-429, 2000.

BRANDHAGEN, D.J.; ALVAREZ, W.; THERNEAU, T.M.; KRUCKEBERG, K.E.; THIBODEAU, S.N.; LUDWIG, J.; PORAYKO, M.K. Iron overload in cirrhosis – *HFE* genotype and outcomes after liver transplantation. **Hepatology**, v. 31, p. 456-460, 2000.

BRISSOT, P.; WRIGHT, T.; MA, W.; WEISEGER, R. Efficient clearance of non-transferrin-bound iron by rat liver. Implications for hepatic iron loading in iron overload states. **J. Clin. Invest.**, v. 76, p. 1463-1470, 1985.

BRITTON, R.S.; FLEMING, R.E.; PARKKILA, S.; WAHEED, A.; SLY, W.S.; BACON, B.R. Pathogenesis of hereditary hemochromatosis: genetics and beyond. **Sem. Gastroenterol. Dis.**, v. 13, p. 68-79, 2002.

BUSH V.J.; MOYER, T.P. Iron and manganese concentration in fresh and formalin fixed tissues [abstract]. **Clin. Chem.**, v. 39, p. 1197 A, 1998.

CAPRON, J.-P.; REDMOND, A.; DUPAS, J.-L.; MANCHERON, H.; CARRON-CHIURA, C.D.; BRAILON, A. Hepatic hemosiderosis in extra-hepatic portal obstruction: role of spontaneous portosystemic shunting? **Dig. Dis. Sci.**, v. 3, p. 889-892, 1986.

CARELLA, M.; D'AMBROSIO, L.; TOTARO, A.; GRIFA, A.; VALENTINO, M.A.; PIPERNO, A.; GIRELLI, D.; ROETTO, A.; FRANCO, B.; GASPARINI, P.; CAMASCHELLA, C. Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 60, p. 828-832, 1997.

CHAPMAN, R.W.; MORGAN, M.Y.; LAULICHT, M.; HOLLBRAND, A.V.; SHERLOCK, S. Hepatic iron stores and markers of iron overload in alcoholic and patients with hemochromatosis. **Dig. Dis. Sci.**, v. 27, p. 909-916, 1982.

CHILD, C.G.; TURCOTTE, J.G. Major problems in clinical surgery. In: Child C.G. (Ed.). **The liver and portal hypertension**. New York: WB Saunders, 1964.

CONN, H.O. Portocaval anastomosis and hepatic hemosiderosis deposition: a prospective controlled investigation. **Gastroenterology**, v. 62, p. 61-72, 1972.

COTLER, S.J.; BRONNER, M.P.; PRESS, R.D.; CARLSON, T.H.; PERKINS, J.D.; EMOND, M.J.; KOWDLEY, K. End-stage liver disease without hemochromatosis associated with elevated hepatic iron index. **J. Hepatol.**, v. 29, p. 257-262, 1998.

DE SOUZA, M.; REIMÃO, R.; LACERDA, R.; HUGO, P.; KAUFMANN, S.H.E.; PORTO, G. Iron overload in β_2 -microglobulin-deficient mice. **Immunol. Lett.**, v. 39, p. 105-111, 1994.

DE KNEGT, R.J.; HEPKEMA, B.G.; SLOOFF, M.H.J.; JANSEN, P.L.M. Hemochromatosis gene mutation in liver transplant patients.[Abstract]. **Hepatology**, v. 26, p. 499 A, 1997.

DE VILLIERS, J.N.; HILLERMAN, R.; LOUBSER, L.; KOTZE, M.J. Spectrum of mutations in the *HFE* gene implicated in haemochromatosis and porphyria. **Hum. Mol. Genet.**, v. 8, p. 1517-1522, 1999.

DEUGNIER, Y.; TURLIN B.; LE QUILLEUC, D.; MOIRAND, R.; LOREAL, O.; MESSNER, M.; MEUNIER, B.; BRISSOT, P.; LAUNOIS, B. A reappraisal of hepatic siderosis in patients with end-stage cirrhosis: practical implications for the diagnosis of hemochromatosis. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 21, p. 669-675, 1997.

DEVALIA, V.; CARTER, K.; WALKER, AP.; PERKINS, S.J.; WOEWOOD, M.; MAY, A.; DOOLEY, J.S. Autosomal dominant reticuloendotelial iron overload associated with a 3-base pair deletion in ferroportin 1 gene (SLC11A3). **Blood**, v. 100, p. 695-697, 2002.

DI BISCEGLIE, A.M.; AXIOTIS, C.A.; HOOFNAGLE, J.H.; BACON, B.R. Measurement of iron status in patients with chronic hepatitis. **Gastroenterology**, v. 102, p. 2108-2113, 1992.

DONOVAN, A; BROWNLIE, A; ZHOU, Y.; SHEPARD, J.; PRATTS, J.; MOYNIHAN, J.; PAW, B.H.; DREJER, A; BARUT, B.; ZAPATA, A; LAW, T.C.; BRUGNARA, C.; LUX, S.E.; PINKUS, G.S.; PINKUS, J.L.; KINGSLEY, P.D.; PALLIS, J.; FLEMING, M.D.; ANDREWS, N.C.; ZON, L.I. Positional cloning of zebrafish ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron transporter. **Nature**, v. 403, p. 776-781, 2000.

ECKER, J.A.; GRAY, P.A.; McKITTRICK, J.E.; DICKSON, D.R. The development of postshunt hemochromatosis: parenchymal siderosis in patients with cirrhosis occurring after portosystemic shunt surgery. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 50, p. 13-29, 1968.

EGAWA, H.; BERQUIST, W.; GARCIAKENNEDY, R.; COX, K.;KNISELY, A.S.; ESQUIVEL, C.O. Rapid development of hepatocellular siderosis after liver transplantation for neonatal hemochromatosis. **Transplantation**, v. 62, p. 1511-1513, 1996.

FAGIOULI, S., HASSANEIN, T.; GURAKAR, A., CARACENI, P., WRIGHT, H.I.; TABASCO-MIGUILLAN, J., GAVALER, J.S., DEAL, S.; VAN THIEL, D.H. Liver transplantation for hereditary hemochromatosis (HHC). **Gastroenterology**, v. 104, p. A898, 1993.

FARRELL, F.J.; NGUYEN, M.; WOODLEY, S.; IMPERIAL, J.C.; GARCIA-KENNEDY, R.; MAN, K.; ESQUIVEL, C.O.; KEEFFE, E.B. Outcome of liver transplantation in patients with hemochromatosis. **Hepatology**, v. 20, p. 404-410, 1994.

FEDER, J.N., GNIRKE A.; THOMAS, W.; TSUCHIHASWI, Z., RUDDY, D.A.; BASAVA, A.; DORMISHIAN, F.; DOMINGO, R. Jr; ELLIS, M.C.; FULLAN, A.; HINTON, L.M.; JONES, N.L.; KIMMEL, B.E.; KRONMAL, G.S.; LAUER, P.; LEE, V.K.; LOEB, D.B.; MAPA, F.A.; McCLELLAND, E.; MEYER, N.C.; MINTIER, G.A.; MOELLER, N.;

MOORE, T.; MORIKANG, E.; PRASS, C.E.; QUINTANA, L.; STARNES, S.M.; SCHATZMAN, R.C.; BRUNKE, K.J.; DRAYNA, D.T.; RISCH, N.J.; BACON, B.R.; WOLFF, R.K. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. **Nat. Genet.**, v. 13;399-408, 1996.

FEDER, J.N.; TSUCHIHASHI, Z.; IRRINKI, A.; LEE, V.K.; MAPA, F.A.; MORIKANG, E.; PRASS, C.E.; STARNES, S.M.; WOLF, R.K.; PARKKILA, S.; SLY, W.S.; SCHATZMAN, R.C. The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupt β -2 microglobulin interaction and cell surface expression. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 14025-14028, 1997.

FEDER, J.N.; PENNY, D.M.; IRRINKY, A.; LEE, V.K.; LEBRÓN, J.A.; WATSON, N.; TSUCHIHASHI, Z.; SIGAL, E.; BJORKMAN, P.J.; SCHATZMAN, R.C. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for the ligand binding. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 1472-1477, 1998.

FIEL, MI; VARMA, C.V.R.; KING, T.W.; MILLER, C.M.; BODENHEIMER, H.C.; THUNG, S.N. Outcome of patients with hemochromatosis following liver transplantation and assessment of iron reaccumulation. **Gastroenterology**, v. 104, p. 900, 1993.

FIEL, M.I., SCHIANO, T.D.; BODENHEIMER Jr, H.C.; THUNG, S.N.; KING, T.W.; RATHNA VARMA, C.; MILLER, C.M.; BRUNT, E.M.; STARNES, S.; PRASS, C.; WOLFF, R.K.; BACON, B.R. Hereditary hemochromatosis in liver transplantation. **Liver Transpl. Surg.**, v. 5, p. 50-56, 1999.

FLEMING, R.E.; MIGAS, M.C.; ZHOU, X.Y.; JIANG, J.; BRITTON, R.S.; BRUNT, E.M.; TOMATSU, S.; WAHEED, A.; BACON, B.R.; SLY, W.S. Mechanism of increased iron absorption in murine model of hereditary hemochromatosis: increased duodenal expression of the iron transporter DMT1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 3143-3148, 1999.

GIRELLI, D.; BOZZINI, C.; ROETTO, A; ALBERTI, F.; DARAI, F.; COLOMBARI, R.; OLIVIERI, R.; CORROCHER, R.; CAMASCELLA, C. Clinical and pathologic findings in hemochromatosis type 3 due to a novel mutation in transferrin receptor 2 gene. **Gastroenterology**, v. 122, p. 1295-1302, 2002.

GRACE, N.D.; BALINT, J.A. Hemochromatosis associated with end-to-side portocaval anastomosis. **Am. J. Dig. Dis.**, v. 11, p. 351-358, 1966.

GRIFFITHS, W.J.H.; SLY, W.S.; COX, T.M. Intestinal iron uptake determined by divalent metal transporter is enhanced in HFE-deficient mice with hemochromatosis. **Gastroenterology**, v. 120, p. 1420-1429, 2001.

GROSS, C.N., IRRINK, A., FEDER, J.N.; ENNS, C.A. Co-trafficking of HFE, a nonclassical major histocompatibility complex class I protein, with the transferrin receptor implies a role in intracellular iron regulation. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 22068-22074, 1998.

GUNSHIN, H.; MACKENZIE, B.; BERGER, U.V.; GUNSHIN, Y.; ROMERO, M.F.; BORON, W.F.; NUSSBERGER, S.; GOLLAN, J.L.; HEDIGER, M.A. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-iron transporter. **Nature**, v. 388, p. 482-488, 1997.

HOUK, R.S. Mass spectrometry of inductively coupled plasmas. **Anal. Chem.**, v. 57, p. 97 A- 105 A, 1986.

JAZWINSKA, E.C.; CULLEN, L.M.; BUSFIELD, F.; PYPER, W.R.; WEBB, S.I.; POWELL, L.W.; MORRIS, C.P.; WALSA, T.P. [letter] Haemochromatosis and *HLA-H*. **Nat. Genet.**, v. 14, p. 249-251, 1996.

KENT, G.; POPPER, H. Liver biopsy in diagnosis of hemochromatosis. **Am. J. Med.**, v. 44, p. 837-841, 1968.

KOWDLEY, K.V.; TUNG, B.Y.; HAN, S.; BASS, N.M.; GISH, R.G.; BRANDHAGEN, D.J.; STERLING, R.; COTLER, S.; FONTANA, R.; McCASHLAND, T.; EDMOND, M. AND NHTR INVESTIGATORS. Prevalence of hepatic iron overload and *HFE* mutations among orthotopic liver transplant recipients: preliminary results from the National Hemochromatosis Transplant Registry. [Abstract]. **Hepatology**, v. 32, p. 248 A, 2000.

LEBRÓN, J.A.; BJORKMAN, P.J. The transferrin receptor binding site on HFE, the class I MHC-related protein mutated in hereditary hemochromatosis. **J. Mol. Biol.**, v. 289, p. 1109-1118, 1999.

LOMBARD, C.M.; STRAUCHEN, J.A. Postshunt hemochromatosis with cardiomyopathy. **Hum. Pathol.**, v. 1149-1151, 1981.

LUDWIG, J.; HASHIMOTO, E.; PORAYKO, M.K.; MOYER, T.P.; BALDUS, W.P. Hemosiderosis in cirrhosis: a study of 447 native livers. **Gastroenterology**, v. 112, p. 882-888, 1997.

LUDWIG, J.; BATTS, K.P. **Practical liver biopsy interpretation**: diagnostic algorithms. 2nd ed. Chicago: ASCP Press, 1998.

MAGGIONI, M.; FURTH, E.E. Hepatocellular hemosiderin accumulation post orthotopic liver transplantation: correlation with primary disease and native liver hemosiderin. [Abstract]. **Mod. Pathol.**, v. 12, p. 164 A, 1999.

MARTINEZ, P.A.; BIRON, C.; BLANC, F.; MASMEJEAN, C.; JEANJEAN, P.; MICHEL, H.; SCHVED, J-F. Compound heterozygotes for hemochromatosis gene mutations: may they help to understand the pathophysiology of the disease? **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 15, p. 269-276, 1997.

MATTMAN, A.; HUNTSMAN, D.; LOCKITCH, G.; LANGLOIS, S.; BUSKARD, N.; RALSTON, D.; BUTTERFIELD, Y.; RON, P.; JONES, S.; PORTO, M.; MARRA, M.; DE SOUZA, M.; VATCHER, G. Transferrin receptor 2 (TfR2) and *HFE* mutational analysis in non-C282Y iron overload identification of a novel TfR2 mutation. **Blood**, v. 100, p. 1075-1077, 2002.

McKIE, A.T.; MARCIANI, P.; ROLFS, A.; BRENNAN, K.; WEHR, K.; BARROW, D.; MITER, S.; BOMFORD, A.; PETERS, T.J.; FARZANETH, F.; HEDIGER, M.A.; HENTZE, M.W.; SIMPSON, R.J. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. **Mol. Cell**, v. 5, p. 299-309, 2000.

McKIE, A.T.; BARROW, D.; LATUNDE-DADA, G.O.; ROLFS, A.; SAGER, G.; MUDALY, M.; RICHARDSON, O.C.; BARLOW, D.; BOMFORD, A.; PETERS, T.J.; RAJA, K.B.; HEDIGER, M.A.; FARZANETH, F.; SIMPSON, R.J. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. **Science**, v. 291, p. 1755-1759, 2001.

McLAREN, G.D.; NATHANSON, M.H.; JACOBS, A.; TRVETT, D.; THOMSON, W. Regulation of intestinal iron absorption and mucosal iron kinetics in hereditary hemochromatosis. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 177, p. 390-401, 1991.

MINGUILLAN, J.T.; LEE, R.G.; BRITTON, R.; WOLF, R.; DEMETRIS, A.J.; BACON, B.; RAKELA, J. Genetic markers for hereditary hemochromatosis in patients with cirrhosis and iron overload. [Abstract] **Hepatology**, v. 26, p. 158 A, 1997.

MORGAN, E.H. Iron metabolism and transport. In: ZAKIM, D.; BOYER, T.D. (Eds). **Hepatology: a textbook of liver disease**. 3rd ed. Philadelphia: W.B. SAUNDERS, 1996. p. 526-554.

MURA, C.; RAGUENES, O.; FEREC, C. *HFE* mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implications in mild form of hemochromatosis. **Blood**, v. 93, p. 2502-2505, 1999.

NICOLAS, G.; BENNOUN, M.; DEVAUX, I.; BEAMOUNT, C.; GRANDCHAMP, B.; KAHN, A.; VAULONT, S. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 8780-8785, 2001.

NICOLAS, G.; CHAUVET, C.; VIATTE, L.; DANAN, J.L.; BIGARD, X.; DAVAUX, I.; BEAUMONT, C.; KAHN, A.; VAULONT, S. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia and inflammation. **J. Clin. Invest.**, v. 110, p. 1037-1044, 2002.

NIXON, D.D. Spontaneous shunt siderosis. **Am. J. Dig. Dis.**, v. 11, p. 359-366, 1966.

OLYNYK, J.K.; O'NEILL, R.; BRITTON, R.S.; BACON, B.R. Determination of hepatic iron concentration in fresh and paraffin-embedded tissue. diagnostic implications. **Gastroenterology**, v. 106, p. 674-677, 1994.

PARKKILA, S.; WAHEED, A.; BRITTON, R.S.; FEDER, J.N.; TSUCHIHASHI, Z.; SCHATZMAN, R.C.; BACON, B.R.; SLY, W.S. Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in pattern of expression in gastrointestinal tract. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 2534-2539, 1997.

PARKKILA, S.; NIEMELÄ, O.; BRITTON, R.S.; FLEMING, R.E.; WAHEED, A.; BACON, B.; SLY, W.S. Molecular aspects of iron absorption and HFE expression. **Gastroenterology**, v. 121, p. 1489-1496, 2001.

PASCOE, A.; KERLIN, P.; STEADMAN, C.; CLOUSTON, A.; JONES, D.; POWELL, L.; KERLIN, P.; STEADMAN, C.; CLOUSTON, A.; JONES, D.; POWELL, L.; JAZWINSKA, E.; LYNCH, S.; STRONG, R. Spur cell anemia and hepatic iron stores in patients with alcoholic liver disease undergoing orthotopic liver transplantation. **Gut**, v. 45, p. 301-395, 1999.

PHILPOTT, C.C. Molecular aspects of iron absorption: insights into the role of HFE in hemochromatosis. **Hepatology**, v. 35, p. 993-1001, 2002.

PIETRANGELO, A. Iron, oxidative stress and liver fibrogenesis. **J. Hepatol.**, v. 28, p. 8-13, 1998.

PIGEON, C.; ILYIN, G.; COURSELAUD, B.; LEROYER, P.; TURLIN, B.; BRISSOT, P.; LOREAL, O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human anti-microbial peptide hepcidin is overexpressed during iron overload. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 7811-7819, 2001.

PILLAY, P.; TZORACOLEFTHERAKIS, E.; TAZKIS, A.G.; KAKIZOE, S.; VAN THIEL D.H.; STARZL, T.E. Orthotopic liver transplantation for hemochromatosis. **Transplant. Proc.**, v. 23, p. 1888-1889, 1991.

PIPERNO, A.; AROSIO, C.; FOSSATI, L.; VIGANO, M.; TROMBINI, P.; VERGANI, A.; MANCIA, A. Two novel nonsense mutations of *HFE* gene in five unrelated italian patients with hemochromatosis. **Gastroenterology**, v. 119, p. 441-445, 2000.

POULOS, J.E.; BACON, B.R. Liver transplantation for hereditary hemochromatosis. **Dig. Dis.**, v. 14, p. 316-322, 1996.

POWELL, L.W. Does transplantation of the liver cure genetic hemochromatosis? **J. Hepatol.**, v. 16, p. 259-261, 1992.

POWELL, L.W., LEGGERTT, B.A., CRAWFORD, D.H.G. Hemochromatosis and the iron storage disorders. In: SCHIFF E.R.; SORREL, M.F.; MADDREY, W.C. (eds). **Schiff's diseases of the liver**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999. p. 1107-1130.

POWELL, L.W.; YAPP, T.R. Hemochromatosis. **Clin. Liver Dis.**, v. 4, p. 211-228, 2000.

PRATSCHKE, J.; STEINMÜLLER, T.; BECHSTEIN, W.O.; NEUHAUS, R.; TULLIUS, S.G.; JONAS, S.; SCHUMACHER, G.; LUCK, W.; BECKER, M.; NEUHAUS, P. Orthotopic liver transplantation for hepatic metabolic disorders. **Clin. Transplant.**, v. 12, p. 228-232, 1998.

ROTHENBERG, B.E.; VOLAND, J.R. β_2 Knockout mice develop parenchymal iron overload: a putative role for class I genes of the major histocompatibility complex in iron metabolism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 1529-1534, 1996.

SABESIN, S.M.; THOMAS, L.B. Parenchymal siderosis in patients with preexisting portal cirrhosis. **Gastroenterology**, v. 46, p. 477-485, 1964.

SALTER-CID, L.; BRUNMARK, A.; LI, Y.; LETURCQ, D.; PETERSON, P.A.; JACKSON, M.R.; YANG, Y. Transferrin receptor is negatively modulated by the hemochromatosis protein HFE: implications for cellular iron homeostasis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 5434-5439, 1999.

SANCHEZ, M.; BRUGUERA, M.; BOSCH, J.; RODES, J.; BALLESTA, F.; OLIVA, R. Prevalence of the Cys282Tyr and His63Asp gene mutations in Spanish with hereditary hemochromatosis and in controls. **J. Hepatol.**, v. 29, p. 725-728, 1998.

SANTOS, M.; SHILHAM, M.W.; RADEMAKERS, L.H.P.M.; MARX, J.J.M.; de SOUZA, M.; CLEVERS, H. Defective iron homeostasis in β_2 -microglobulin knockout mice recapitulates hereditary hemochromatosis in man. **J. Exp. Med.**, v. 184, p. 1975-1985, 1996.

SCHAEFER, J.W.; AMICK, C.J.; OIKAWA, Y.; SCHIFF, L. The development of hemochromatosis following portacaval anastomosis. **Gastroenterology**, 181-188, 1962.

SEARLE, J.W.; KERR, J.F.R.; HALLIDAY, J.W.; POWELL, L.W. Iron storage disease. In: MacSWEEN, R.N.M.; ANTHONY P.P.; SCHEUER, P.J.; BURT, A.D.; PORTMANN, B.C. (Eds). **Pathology of the liver**. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994. p. 219-241.

STUART, KA; FLETCHER, L.M.; CLOUSTON, AD; LYNCH, S.V.; PURDIE, D.M.; KERLIN, P.; CRAWFORD, D.H. Increased hepatic iron and cirrhosis: No evidence for an adverse effect on patient outcome following liver transplantation. **Hepatology**, v. 32, p. 1200-1207, 2000.

SURAKOMOL, S.; OLSON, L.J.; RASTOGI, A.; STEERS, J.L.; STERIOFF, S.; DALY, R.C.; MCGREGOR, C.G.A. Combined orthotopic heart and liver transplantation for genetic hemochromatosis. **J. Heart Lung Transplant.**, v. 16, p. 573-575, 1997.

THE UK HAEMOCHROMATOSIS CONSORTIUM (WORWOOD, M.; SHERMAN, J.D.; WALLACE, D.F.; DOOLEY, J.S.; MERRYWEATHER-CLARKE, A.T.; POINTON, J.J.;

ROSENBERG, W.M.C.; BOWEN, D.J.; BURNETT, A.K.; JACKSON, H.A.; LAWLWSS, S.; RAHA-CHOWDHURY, R.; PARTRIDGE, J.; WILLIAM, S.R.; BOMFORD, A.; WALKER, A.P.; ROBSON, K.J.H.) A simple genetic test identifies 90% of UK patients with haemochromatosis. **Gut**, v. 41, p. 841-844, 1997.

TISDALE, W.A. Parenchymal siderosis in patients with cirrhosis after portasystemic-shunt surgery. **New Engl. J. Med.**, v. 265, p. 928-932, 1961.

TRINDER, D., OLYNYK, J.K.; SLY, W.S., OLYNYK, J.K., SLY, W.S., MORGAN, E.H. Iron uptake from plasma transferrin by the duodenum is impaired in the Hfe knockout mouse. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 5622-5626, 2002.

TURLIN, B.; DEUGNIER, Y. Iron overload disorders. **Clin. Liver Dis.**, v. 6, p. 481-496, 2002.

TUTTLE, S.G.; FIGUEROA, W.G.; GROSSMAN, M.I. Development of hemochromatosis in a patient with Laennec's cirrhosis. **Am. J. Med.**, v. 26, p. 655-658, 1959.

VULPE, C.D.; KUO, Y.-M.; MURPHY, T.L.; COWLEY, L.; ASKWITH, C.; LIBINA, N.; GITSCHIER, J.; ANDERSON, G.L. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in *sla* mouse. **Nat. Genet.**, v. 21, p. 195-199, 1999.

WAHEED A., PARKKILA, S., ZHOU, X.Y.; TOMATSU, S.; TSUCHIHASHI, Z.; FEDER, J.N.; SCHATZMAN, R.C.; BRITTON, R.S.; BACON, B.R.; SLY, W.S. Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with β_2 -microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 12384-12389, 1997.

WALLACE, D.D.; PEDERSEN, P.; DIXON, J.L.; STEPHENSON, P.; SEARLE, J.W.; POWELL, L.W.; SUBRAMANIAM, V.M. Novel mutation in ferroportin 1 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. **Blood**, v. 100, p. 692-694, 2002.

WILLIAMS, R., WILLIAMS, H.S.; SCHEUER, P.J.; PITCHER, C.S., LOISEAU, E., SHERLOCK, S. Iron absorption and siderosis in chronic liver disease. **Q. J. Med.**, v. 36, p. 151-166, 1966.

YOUNG, S.P.; AISEN, P. The liver and iron. In: ARIAS, I.M.; BOYER, J.L.; FAUSTO, N.; JAKOBY, W.B.; SCHACHTER, D.A.; SHAFRITZ, D.A. **The liver: biology and pathobiology**. 3rd ed. New York: Raven Press, 1994. p. 597-617.

ZHOU, X.Y.; TOMATSU, S.; FLEMING, R.E.; PARKKILA, S.; WAHEED, A.; JIANG, J.; FEI, Y.; BRUNT, E.M.; RUDDY, D.A.; PRASS, C.E.; SHATZAN, R.C.; O'NEILL, R.; BRITTON, R.S.; BACON, B.R.; SLY, W.S. *HFE* gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 2492-2497, 1998.

ZOLLER, H.; PIETRANGELO, A.; VOGEL, W.; WEISS, G. Duodenal metal-transporter (*DMT-1*, *NRAMP-2*) expression in patients with hereditary haemochromatosis. **Lancet**, v. 353, p. 2120-2123, 1999.

ZOLLER, H.; KOCH, R.O.; THEURL, I.; OBRIST, P.; PIETRANGELO, A.; MONTOSI, G.; HAILE, D.J.; VOGEL, W.; WEIS, G. Expression of the duodenal iron transporter divalent-metal transporter1 and ferroportin 1 in iron deficiency and iron overload. **Gastroenterology**, v. 120, p. 1412-1419, 2001.